

**TERMINATOR-WIRKSAME
SEQUENZEN
FÜR DIE T7 RNA-POLYMERASE**

Wolfgang Weiß

Disbui. München

1989

THE AMERICAN
LIBRARY
OF THE
CONGRESS



AMERICAN LIBRARY OF THE CONGRESS



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

TERMINATOR-WIRKSAME
SEQUENZEN
FÜR DIE T7 RNA-POLYMERASE

von

Wolfgang G. C. Weiß

München

1989

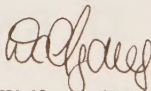
Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §12 (3) der Promotionsordnung vom 5.3.1981 von Prof. Dr. G.R. Hartmann betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt.

München, den 12.1.1989


Wolfgang Weiß

Die Arbeit wurde eingereicht am 12.1.1989

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G.R. Hartmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E.L. Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 15.3.1989

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 1985 bis Dezember 1988 auf Anregung und unter Anleitung von Prof. Dr. G. R. Hartmann am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt.

Bedanken möchte ich mich bei Dr. S. Tabor, Harvard Medical School für die T7 Vektoren und das Plasmid pGP1-2 mit dem T7 RNA-Polymerase Gen und bei Prof. Dr. W. McAllister für die gereinigte T7 RNA-Polymerase.

Ebenso danke ich Herrn Dr. R. Mertz, Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die erfolgreiche Synthese der Oligonukleotide.

Frau H. Sieber danke ich für das Erstellen der Filmnegative.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Hartmann, sowie allen Kolleginnen und Kollegen aus unserem Institut, für die gute Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und die Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

INHALTSVERZEICHNIS

VERZEICHNIS DER FIGUREN UND TABELLEN	VIII
ZUSAMMENFASSUNG	XII
EINLEITUNG	1
MATERIAL	
1. Bakterienstämme	8
2. Nukleinsäuren	8
3. Enzyme	9
4. Nukleotide	9
5. Chemikalien und andere Materialien	10
6. Geräte	11
METHODEN	
1. Vermehrung von Bakterien	
1.1. Vermehrung auf Agarplatten	13
1.2. Vermehrung im flüssigen Medium	13
1.3. Herstellung transformationskompetenter Zellen	13
1.4. Transformation von Bakterien	13
1.5. Aufbewahrung von Bakterienstämmen	14
2. Isolierung von DNA	
2.1. Reinigung von Oligonukleotiden	14
2.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> durch Schnellaufschluß	14
2.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> durch CsCl-Gradientenzentrifugation	15
2.4. Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen	15
2.5. Isolierung von DNA aus Polyacrylamid-Gelen	17
2.6. Konzentrierung und Reinigung von DNA	17

3. Enzymatische Reaktionen an DNA	
3.1. Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	18
3.2. Abspaltung der 5'-terminalen Phosphatgruppe	18
3.3. Auffüllen von 5'-überhängenden Enden	19
3.4. Ligation von DNA-Fragmenten	19
3.5. [^{32}P]-Markierung von DNA-Molekülen durch Nick-Translation	20
3.6. [^{32}P]-Endmarkierung von DNA-Fragmenten	21
3.7. DNA-Sequenzierung	21
4. Identifizierung rekombinanter Klone	
4.1. Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA aus einem Schnellaufschluß	22
4.2. Koloniehybridisierung	22
5. Elektrophoretische Trennmethode	
5.1. Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	24
5.2. Nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
5.3. Agarose-Harnstoff-Gelelektrophorese zur Auftrennung zellulärer RNA	24
5.4. Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese	24
5.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen	27
6. Konstruktion von Plasmid-Vektoren	
6.1. Vektoren mit synthetischen DNA-Fragmenten	27
6.2. Vektoren mit Fragmenten aus T7 DNA	35
6.3. Vektoren mit DNA-Sequenzen aus dem <i>E. coli</i> <i>rrnB</i> Operon	46
6.4. Vektoren mit dem 3d ^{ri} Gen	52
6.5. Vektoren mit dem Tet-Gen aus pBR322	55
6.6. Vektoren mit dem Cat-Gen aus pSV0-Cat	57
6.7. Transformation von <i>E. coli</i> K38/pGP1-2 Bakterien mit T7 Vektoren	59

7. Isolierung von RNA	
7.1. Isolierung von RNA in einem Rohextrakt aus <i>E. coli</i>	63
7.2. Anreicherung von zellulärer RNA aus <i>E. coli</i>	63
8. Reaktionen mit RNA	
8.1. <i>In vitro</i> Transkription mit T7 RNA-Polymerase	64
8.2. RNA-Sequenzierung	65
8.3. Northern-Hybridisierung von zellulärer RNA	65
9. Induktion der Synthese von RNA und Proteinen in einem T7 Expressionssystem	
9.1. Beschreibung des T7 Systems von Tabor und Richardson (1985)	66
9.2. Induktion der RNA-Synthese	68
9.3. Induktion der Protein-Synthese mit [³⁵ S]- Methionin-Markierung	68
9.4. Induktion der Protein-Synthese ohne radioaktive Markierung	69
10. Messung der Expression des Tet-Proteins	
10.1. Nachweis der Tet-Expression auf Agarplatten	70
10.2. Nachweis der Tet-Expression im Flüssigmedium	70
11. Immunchemische Messung der Expression des Proteins Rif-IIb	
11.1. Lysis der Bakterien	71
11.2. Western-Blot	71
11.3. Nachweis der Proteinexpression mit Antikörpern	72
12. Messung der enzymatischen Aktivität von Cat in Bakterienextrakten	
12.1. Lysis der Bakterien	72
12.2. Cat-Aktivitätstest	73

ERGEBNISSE

1. Untersuchungen zur Termination <i>in vitro</i>	
1.1. Termination an synthetischen Oligonukleotiden	74
1.2. Termination an DNA-Fragmenten aus T7	86
1.3. Termination am <i>E. coli</i> <i>rrnB</i> Operon	94
1.4. Termination am <i>E. coli</i> Rifampicin-Resistenzgen $3d^{rif}$	107
1.5. Bestimmung der Terminationsstellen an den Fragmenten T, S1 und S2 durch Transkriptsequenzierung	114
1.6. Einfluß von Reaktionsbedingungen auf die Termination am DNA-Fragment T	120
1.7. Bestimmung der Effizienz von T7 Terminatoren	128
2. Untersuchungen zur Termination <i>in vivo</i>	
2.1. RNA-Synthese an T7 Plasmiden mit dem Tetracyclin-Resistenzgen	139
2.2. RNA-Synthese an T7 Plasmiden mit dem $3d^{rif}$ Gen	149
2.3. RNA-Synthese an T7 Plasmiden mit dem Cat-Gen	152
3. Einfluß von Terminatoren bei der Genexpression durch T7 RNA-Polymerase auf Proteinebene	
3.1. Analyse der Proteinbiosynthese durch SDS-PAGE	155
3.2. Messung der Expression des Tet-Gens über die Tetracyclin-Resistenz von Bakterien	167
3.3. Nachweis der Expression des Proteins Rif-IIb mit spezifischen Antikörpern	173
3.4. Messung der Cat-Gen Expression durch Bestimmung der Enzymaktivität	176

DISKUSSION	181
------------	-----

LITERATURVERZEICHNIS	197
----------------------	-----

ABKÜRZUNGEN	210
-------------	-----

VERZEICHNIS DER PLASMIDE	211
--------------------------	-----

LEBENS LAUF	212
-------------	-----

VERZEICHNIS DER FIGUREN UND TABELLEN

Fig. 1:	Genom von T7 mit den Terminatoren TE und TPhi	7
Fig. 2:	DNA-Sequenz der aus komplementären Oligonukleotiden bestehenden synthetischen Fragmente T, K, S1 und S2	28
Fig. 3:	Restriktionsspaltung von pUC18, pUC18T, pT7-4, pT7-4T, pT7-4S1, pT7-4S2 und pT7-5K	29
Fig. 4:	Durch Plasmidsequenzierung ermittelte Basenfolge der Insertionen in pUC18T, pUC12K, pUC19S1 und pUC19S2	30/31
Fig. 5:	Schematische Darstellung der Plasmide pT7-4, pT7-5 und pT7-6	33
Fig. 6:	Konstruktion der Plasmide pT7-4T, pT7-4S1, pT7-4S2 und pT7-5K	34/35
Fig. 7:	Restriktionsspaltungen von T7 DNA und den Plasmiden pUC18CB, pT7-4CB, pT7-4TPhiR und pT7-4TPhiL	36/37
Fig. 8:	Konstruktion der Plasmide pUC18CB und pT7-4CB	38/39
Fig. 9:	Konstruktion der Plasmide pT7-4TPhiR und pT7-4TPhiL	40/41
Fig. 10:	Restriktionsspaltung des Fragments T7- <i>Cla</i> D und der Plasmide pUC18DA und pT7-4DA	43
Fig. 11:	Konstruktion der Plasmide pUC18DA und pT7-4DA	44/45
Fig. 12:	Konstruktion des Plasmids pT7-R	47
Fig. 13:	Restriktionsspaltung der Plasmide pKK223-3, pT7-R pT7-R1, pT7-R2, pT7-R2T und pT7-R3T	48/49
Fig. 14:	Subklonierung des Fragments R in die Plasmide pT7-4 und pT7-4T	50/51
Fig. 15:	Konstruktion von pRif-4, pRif-6 und pRif-4T	53
Fig. 16:	Restriktionsspaltung der Plasmide pRif-4, pRif-6 und pRif-4T	54
Fig. 17:	Konstruktion der Plasmide, pTet-4, pTet-6, pTet-4T und pTet-6T	56/57
Fig. 18:	Restriktionsspaltung der Plasmide pTet-4, pTet-6 pTet-4T und pTet-6T	58
Fig. 19:	Konstruktion der Plasmide pCat-4, pCat-6, pCat-4T, pCat-6T, pCat-4S1 und pCat-4S2	60

Fig. 20:	Hydrolyse der Plasmide mit Cat-Insertion	61
Fig. 21:	Konstruktion der Plasmide pCat-6Phi und pCat-6R	62
Fig. 22:	Schematische Darstellung des Plasmids pGP1-2	67
Fig. 23:	Vergleich der <i>in vitro</i> RNA-Synthese an den mit <i>XmnI</i> geschnittenen Plasmiden pT7-4 und pT7-4T	75
Fig. 24:	Schematische Darstellung der Termination an den synthetischen Oligonukleotiden, T, K, S1 und S2	78/79
Fig. 25:	<i>In vitro</i> RNA-Synthese an den Plasmiden pT7-4, pT7-4T pT7-4S1, pT7-4S2 und pT7-5K	80
Fig. 26:	Vergleich der <i>in vitro</i> RNA-Synthese an den Plasmiden pTet-4 und pTet-4T	82
Fig. 27:	<i>In vitro</i> RNA-Synthese an den Plasmiden pT7-4CB, pT7-4TPHiR, pT7-4TPHiL und pT7-4DA	88
Fig. 28:	Schematische Darstellung der Ergebnisse der <i>in vitro</i> RNA-Synthese an Insertionen aus T7 DNA	90/91
Fig. 29:	Schematische Darstellung des <i>E. coli</i> <i>rnb</i> Operons	95
Fig. 30:	<i>In vitro</i> RNA-Synthese an den Plasmiden pT7-R, pT7-R1, pT7-R2, pT7-R2T und pT7-R3T	96
Fig. 31:	Lokalisierung von Terminationsstellen und Promotoren auf dem Fragment R	98/99
Fig. 32:	Basenfolge der Terminationsstellen und Promotoren auf dem <i>E. coli</i> <i>rnb</i> Operon	105
Fig. 33:	Schematische Darstellung des <i>E. coli</i> 3d ^{rif} Gens	108
Fig. 34:	<i>In vitro</i> RNA-Synthese an pRif-4	109
Fig. 35:	Lokalisierung der Terminationsstellen auf 3d ^{rif}	111
Fig. 36:	Basenfolge im Bereich der Terminationsstellen auf dem 3d ^{rif} Gen	113
Fig. 37:	Sequenzierung von Transkripten an den Plasmiden pT7-4T, pT7-4S1 und pT7-4S2	116
Fig. 38:	Lokalisierung aller Terminationsstellen auf den Fragmenten T, S1 und S2	117
Fig. 39:	<i>In vitro</i> RNA-Synthese an pT7-4T/ <i>XmnI</i> in Abhängigkeit von der UTP-Konzentration	124

Fig. 40:	Lokalisierung der durch selektive Verringerung der UTP-Konzentration entstehenden Terminationsstellen auf pT7-4T	126
Fig. 41:	Länge von "Run off" und Terminations-Transkripten bei der Bestimmung der Terminationseffizienz	129
Fig. 42:	<i>In vitro</i> RNA-Synthese an Cat-Plasmiden	135
Fig. 43:	Northern-Hybridisierung gegen zelluläre RNA aus pTet-4T, pBR322 und pRif-4	140/141
Fig. 44:	Northern-Hybridisierung gegen angereicherte zelluläre RNA aus pTet-4 und pTet-4T	145
Fig. 45:	Northern-Hybridisierung gegen zelluläre RNA aus pTet-6 und pTet-6T	148
Fig. 46:	Northern-Hybridisierung gegen zelluläre RNA aus pRif-4 und pRif-4T	150
Fig. 47:	Northern-Hybridisierung gegen zelluläre RNA aus Cat-Plasmiden	153
Fig. 48:	Proteinsynthese bei Tet-Plasmiden	156/157
Fig. 49:	Proteinsynthese bei Rif-Plasmiden	161
Fig. 50:	Proteinsynthese bei Cat-Plasmiden ohne Markierung mit [³⁵ S] Methionin	164
Fig. 51:	Proteinsynthese bei Cat-Plasmiden	166
Fig. 52:	Abhängigkeit des Bakterienwachstums auf Agarplatten gemessen am Koloniedurchmesser von der Tetracyclin-Konzentration	168
Fig. 53: (A und B)	Abhängigkeit des Bakterienwachstums mit pBR322 und pT7-6 in flüssigem Medium von der Tetracyclin-Konzentration	170
Fig. 53: (C und D)	Abhängigkeit des Bakterienwachstums mit pTet-6 und pTet-6T in flüssigem Medium von der Tetracyclin-Konzentration	171
Fig. 54:	Immunchemische Messung der Synthese des Rif-IIb Proteins	175
Fig. 55:	Analyse der Reaktionsprodukte bei der Acetylierung von Chloramphenicol	177
Fig. 56:	Messung der Cat-Enzymaktivität in Bakterienextrakten	179

Fig. 57A:	RNA-Sekundärstruktur des T7 Terminators T	183
Fig. 57B:	Antiterminator-Sekundärstruktur des pT7-4 Polylinkers und der 5'-Hälfte des Terminators T	183
Fig. 58:	RNA-Sekundärstruktur der Terminatoren TPhi-invers, K, S1 und S2 (Stabilität nach Tinoco <i>et al.</i> , 1973)	185
Fig. 59:	RNA-Sekundärstruktur der Terminatoren <i>rrnB</i> -T1, <i>rrnB</i> -T2, Rif-TB, Rif-TY und TE (Stabilität nach Tinoco <i>et al.</i> , 1973)	188
Fig. 60:	RNA-Sekundärstruktur des T7 Terminators Rif-TA	190
Tab. 1:	Einfluß von Reaktionsparametern auf die RNA-Synthese an pT7-4T/ <i>XmnI</i>	122
Tab. 2:	Effizienz von T7 Terminatoren an einer geschnittenen Matrize	132
Tab. 3:	Effizienz von T7 Terminatoren an einer ungeschnittenen Matrize	137

ZUSAMMENFASSUNG

Eine Termination der Transkription durch T7 RNA-Polymerase war zu Beginn dieser Arbeit an einem 1,4 kb langen T7 DNA-Fragment bekannt. Es konnte gezeigt werden, daß als Terminator-wirksame Sequenz für die T7 RNA-Polymerase *in vitro* bereits ein 50 bp langes Fragment T mit den Nukleotiden 24164 bis 24214 des T7 Genoms hinreichend ist. Das Fragment T besteht aus einer palindromen DNA-Sequenz gefolgt von 6 T-Resten und weist damit die Charakteristik eines Faktor-unabhängigen *E. coli* Terminators auf.

Eine Modifikation S2 des 50 bp langen Fragments T mit einer Verlängerung der T₆-Sequenz auf 8 T-Reste hat *in vitro* kaum einen Einfluß auf die Terminationseffizienz. Dagegen bewirkt die Stabilisierung der RNA-Haarnadelstruktur bei der Modifikation S1 *in vitro* eine erhebliche Verbesserung der Terminationseffizienz. Eine zu T transverse Nukleotidsequenz K ist hingegen als Terminator nicht mehr wirksam.

Bei selektiver Verringerung der UTP-Konzentration im Transkriptionsansatz *in vitro*, die eine Verlangsamung der Elongation beim Einbau einer Folge von U-Resten in die RNA-Kette bewirken sollte, wird Verstärkung der Termination am Fragment T und das Entstehen neuer Terminationsstellen nach T-reichen Regionen der Matrize beobachtet.

Diese Befunde stehen im Einklang mit dem Terminationsmodell bei *E. coli* und weisen auf einen nahe verwandten Terminationsmechanismus bei T7 und *E. coli* RNA-Polymerase hin.

Die Transkription durch T7 RNA-Polymerase terminiert am 126 bp langen T7 Fragment *HinP* C (Position 24103 bis 24229 von T7) *in vitro* deutlich besser als am 50 bp langen Fragment T (Position 24164 bis 24214 von T7). Dies kann möglicherweise auf die Ausbildung einer partiell als Antiterminator wirksamen RNA-Sekundärstruktur von Vektorsequenzen mit der 5'-Hälfte des Terminators T zurückgeführt werden.

Ein DNA-Fragment von Position 38802 bis 38680 des T7 Genoms, in dessen Bereich Golomb und Chamberlin (1974) einen Terminator vermuteten, enthält kein *in vitro* wirksames T7 Terminationssignal.

Die *E. coli* Terminatoren *rrnB*-T1 und *rrnB*-T2 (Brosius *et al.*, 1981), sowie der potentielle *E. coli* Terminator Rif-TB auf dem 3d^{rif} Fragment (Heinrich, 1987) werden von T7 RNA-Polymerase *in vitro* erkannt. Ein weiterer potentieller *E. coli* Terminator Rif-TY ist offenbar aufgrund seiner zu geringen RNA-Haarnadel-Stabilität bei Transkription durch T7 RNA-Polymerase nicht aktiv. An einem weiteren *in vitro* wirksamen Terminator Rif-TA auf dem 3d^{rif} Fragment kann sich keine klassische RNA-Haarnadel ausbilden.

Eine partielle Termination *in vivo* wird durch das 50 bp lange Fragment T, dessen Modifikationen S1 und S2, das 126 bp lange T7 Fragment *HinP* C und den *E. coli* Terminator *rrnB*-T1 hervorgerufen. Dagegen konnte eine Wirksamkeit der Terminatoren Rif-TA und Rif-TB *in vivo* nicht gezeigt werden.

Die Anwesenheit des 50 bp langen Terminators T hinter dem Tetracyclin- (Tet) bzw. dem Chloramphenicol-Resistenzgen (Cat) auf einem Plasmid unter Kontrolle eines T7 Promotors bewirkt ohne Induktion der T7 RNA-Polymerase eine Reduzierung der Expression der Antibiotika-Resistenzgene im T7 System von Tabor und Richardson (1985).

Die Synthese des Tet-Proteins wird durch die Anwesenheit des Terminators T auch nach Induktion der T7 RNA-Polymerase reduziert, während bei der Synthese des Cat-Proteins nach Induktion kein Einfluß des Terminators gefunden wird.

Eine Überexpression des Proteins Rif-IIb auf dem *E. coli* 3d^{rif} Fragment, das eine *rpoB* unabhängige Rifampicin-Resistenz vermittelt (Heinrich, 1987), ist durch Induktion der T7 RNA-Polymerase im T7 System von Tabor und Richardson (1985) nicht möglich.

Dies wird offenbar durch eine Regulation der Genexpression auf transkriptionaler oder translationaler Ebene verhindert.

EINLEITUNG

Die Transkription als erster Schritt zur Biosynthese von Proteinen spielt eine zentrale Rolle für das Wachstum und die Entwicklung von Organismen. Die auf der doppelsträngigen chromosomalen DNA gespeicherte genetische Information wird selektiv erkannt und von einer DNA abhängigen RNA-Polymerase (E.C. 2.7.7.6.) abgelesen. Ein Transkriptionszyklus kann in mehrere Schritte unterteilt werden: die Bindung des Enzyms an den Promotor, die Initiation, die Elongation und die Termination der RNA-Synthese (von Hippel *et al.*, 1984). Eine für die Koordination des Zellzyklus notwendige Kontrolle der Genexpression kann am direktesten durch Regulationsmechanismen auf Ebene der Transkription geschehen.

Auf Ebene der Promotorerkennung und der Initiation findet eine Kontrolle der Expression durch die Transkriptionsfrequenz eines Gens - bedingt durch die Promotorstärke - statt. Dabei spielen neben der DNA-Sequenz des Promotors noch andere Parameter eine Rolle, denn im - oder nahe am - Promotorbereich können DNA-bindende Proteine, die als Repressoren oder Aktivatoren wirken, die Effizienz der Transkription sehr stark beeinflussen (Pabo und Sauer, 1984).

Nach Synthese der ersten 8 bis 9 Nukleotide eines Transkripts - der Initiation - beginnt die Elongation. Dabei bewegt sich die RNA-Polymerase in Form einer "Transkriptionsblase" aus Enzym und einem, nur für kurze Zeit stabilen DNA-RNA Hybrid auf dem Gen entlang (Yager und v.Hippel, 1987) und baut - komplementär zur Nukleotidsequenz der Matrize - weitere Ribonukleosid-Triphosphate in die entstehende RNA-Kette ein. Wenn die RNA-Polymerase einem Terminationssignal auf der DNA begegnet, wird der Transkriptionsvorgang beendet. Die Elongation stoppt, das fertige Transkript wird aus dem Komplex mit Matrize und Enzym freigesetzt und schließlich dissoziiert das Enzym von der Matrize ab (von Hippel *et al.*, 1984).

Um die zur Termination führenden Vorgänge besser erklären zu können, muß zuvor noch auf eine Besonderheit bei der Elongation eingegangen werden. Bei prokaryotischen Organismen kann eine Unterbrechung der Elongationsreaktion an bestimmten Bereichen auf der Matrize (Pausenstellen) stattfinden (Gilbert, 1976). Wenige Nukleotide 5'-stromaufwärts dieser Pausenstellen werden oft - aber nicht in jedem

Fall (Kassavetis und Chamberlin, 1981; Grayhack *et al.*, 1985) - palindrome Sequenzbereiche auf der DNA gefunden, in denen die RNA durch intramolekulare Basenpaarung eine selbstkomplementäre Haarnadel-Sekundärstruktur ausbilden kann (Farnham und Platt, 1981). Diese an einem palindromen DNA-Abschnitt entstehenden Pausen-RNA Spezies konnten im Leaderbereich des *trp* Operons des gram-negativen Bakteriums *Escherichia coli* bereits *in vivo* nachgewiesen werden (Landick *et al.*, 1987). Es wird angenommen, daß sich durch Bildung der RNA-Haarnadel das RNA-DNA Hybrid innerhalb der "Transkriptionsblase" auflöst und auf diese Weise ihre Struktur zerstört wird. So kann schließlich die Elongation beendet werden und eine Termination stattfinden (Yager und von Hippel, 1987).

Bei eukaryotischen RNA-Polymerasen ist der Mechanismus der Termination komplexer und nicht so gut erforscht. Die Termination, Prozessierung und Polyadenylierung sind besonders bei Transkription durch die RNA-Polymerase II in höheren Organismen auf verschiedene Weise und sehr eng miteinander gekoppelt. So ist es bislang nicht eindeutig gelungen, den genauen Ablauf dieser Vorgänge zu analysieren (Platt, 1986).

Die Termination bei prokaryotischen Organismen ist am besten bei dem Bakterium *E. coli* aufgeklärt. Dort unterscheidet man zwischen "einfacher" oder Faktor-unabhängiger Termination und Faktor-abhängiger Termination. An Faktor-abhängigen Terminationsstellen findet mit gereinigter RNA-Polymerase *in vitro* keine (oder nur wenig effiziente) Termination statt. Für eine effiziente Termination an Faktor-abhängigen Terminatoren ist die Anwesenheit bestimmter Proteinfaktoren wie Rho (Bear und Peabody, 1988), Tau (Briat und Chamberlin, 1984, Briat *et al.*, 1987) oder NusA (Schmidt und Chamberlin, 1987) erforderlich.

Dagegen sind "einfache" Terminatoren Sequenzbereiche auf der DNA, an denen mit gereinigter RNA-Polymerase *in vitro* ohne zusätzliche Proteinfaktoren eine Termination der Transkription stattfindet. Die Faktor-unabhängigen *E. coli* Terminatoren bestehen in der Regel aus einem GC-reichen palindromen Sequenzbereich auf der DNA, dem sich 3'-seitig 4-8 T-Reste anschließen (Rosenberg und Court, 1979). Ein Transkript kann im Bereich dieses Palindroms eine Haarnadel-Sekundärstruktur mit einer thermodynamischen Stabilität von ca. 80 bis 120 kJ/mol ausbilden. Der Terminationsvorgang findet dann oft am Ende der nachfolgenden oligo(rU) Sequenz statt. Für den Mechanismus einer Faktor-unabhängigen Termination

nimmt man an, daß die RNA-Polymerase durch Ausbildung der RNA-Sekundärstruktur zu einer Pause bei der Elongation gezwungen wird. Die auf der RNA nachfolgende oligo(rU)Sequenz ermöglicht - wegen der sehr geringen Stabilität eines rU-dA RNA-DNA-Hybridbasenpaars (Riley *et al.*, 1966; Martin und Tinoco, 1980) - eine leichte Abdissoziation des Transkripts von der DNA-Matrize (Platt, 1981). Diese strukturellen Eigenschaften der DNA - eine palindrome GC-reiche Sequenz, die von mehreren T-Resten gefolgt wird - sind eine hinreichende Bedingung für eine Faktor-unabhängige Termination. Ihr Vorhandensein ist für die Termination aber nicht unbedingt notwendig, denn an bestimmten Sequenzbereichen auf der DNA, wo diese Eigenschaften fehlen, wird dennoch eine Faktor-unabhängige Termination beobachtet (Brendel und Trifonov, 1984).

In dieser Arbeit sollten nun Untersuchungen über die Termination der Transkriptionsreaktion mit RNA-Polymerase aus dem Bakteriophagen T7 durchgeführt werden.

T7 ist ein lytischer *E. coli* Phage mit einer linearen, doppelsträngigen DNA von 39936 bp Länge (Fig. 1), deren Nukleotidsequenz bekannt ist (Dunn und Studier, 1983; Moffat *et al.*, 1984). Bei Infektion von *Coli* Bakterien erfolgt eine Transkription der frühen Gene von T7 (Klasse I), die auf den ersten 20% des Phagengenoms liegen, durch die wirtseigene *E. coli* RNA-Polymerase (Hyman, 1971). Es wird ein polycistronisches Transkript an drei starken *E. coli* Promotoren (A1, A2 und A3) synthetisiert, das durch die Endonuklease RNase III aus *E. coli* spezifisch in monocistronische mRNAs gespalten wird (Robertson *et al.*, 1977). Eine Termination der frühen Transkription durch die *E. coli* RNA-Polymerase erfolgt am Terminator TE an Position 7588 des T7 Genoms (Dunn und Studier, 1980). Der Terminator TE besitzt die für "einfache" *E. coli* Terminatoren typische GC-reiche palindrome DNA-Sequenz, gefolgt von 4 T-Resten (Dunn und Studier, 1983, Fig. 1).

Unter den T7-Genen der Klasse I befindet sich auch das Gen für eine phageneigene RNA-Polymerase (Gen 1), das sich auf dem T7 Genom zwischen Position 3171 und 5822 befindet. Die T7 RNA-Polymerase besteht aus einer einzigen Polypeptidkette und besitzt ein Molekulargewicht von 98,8 kD (Grachev und Pletnev, 1981; Moffat *et al.*, 1984). RNA-Polymerasen aus Bakterien und Eukaryonten sind dagegen wesentlich komplexere Enzyme, die aus mehreren Untereinheiten aufgebaut sind. Die

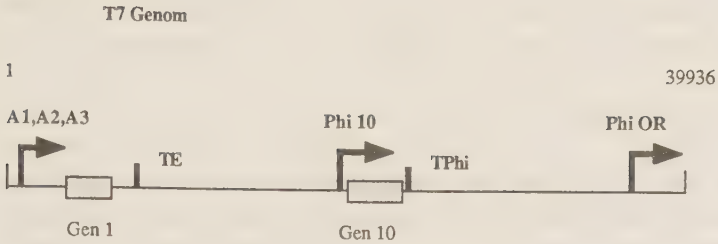
T7 RNA-Polymerase transkribiert die späten Gene von T7 (Klasse II und III) mit sehr großer Effizienz - sie besitzt eine fünffach höhere Elongationsrate als die *E. coli* RNA-Polymerase - (Chamberlin *et al.*, 1983). Sie erkennt selektiv eine spezifische Promotorsequenz, die aus einer 23 bp langen, stark konservierten DNA-Sequenz von -17 bis +6 relativ zum Start der Transkription besteht (Dunn und Studier, 1983). Auf der DNA von *E. coli* wurden keine aktiven T7 Promotoren gefunden (Chamberlin *et al.*, 1970).

Die gleichen Eigenschaften - einfacher Aufbau, hohe Promotorspezifität und Transkriptionseffizienz - besitzen auch die RNA-Polymerasen des verwandten *E. coli* Phagen T3 (McGraw *et al.*, 1985) und des *Salmonella typhimurium* Phagen SP6 (Kassavetis *et al.*, 1981). Mit Hilfe dieser Enzyme konnten wichtige molekularbiologische Methoden entwickelt oder verbessert werden. So gelang es, RNA-Proben mit sehr hoher spezifischer Radioaktivität für Hybridisierungsexperimente (Melton *et al.*, 1984), RNase-Schutzexperimente (Zinn *et al.*, 1984), Translations- und Spleißexperimente, sowie biologisch wirksame "Anti sense" RNA zu synthetisieren (Little und Jackson, 1988).

Die Transkription des T7 Genoms durch die T7 RNA-Polymerase terminiert nicht am frühen *E. coli* Terminator TE (Dunn und Studier, 1980). In der späten Region des T7 Genoms wurde aber eine starke Terminationsstelle für die RNA-Synthese mit der T7 RNA-Polymerase zwischen den Genen 10 und 11 gefunden (Niles und Condit, 1975; McAllister und McCarron, 1977). Diese Terminationsstelle wird als TPhi bezeichnet und wurde auf einem 1415 bp langen *Clai/PvuII* Fragment von Position 22855 und 24270 des T7 Genoms (Studier und Rosenberg, 1981) lokalisiert. Die DNA weist in dieser Region des T7 Genoms eine, für Faktor-unabhängige *E. coli* Terminatoren charakteristische palindrome Sequenz auf, der sich 6 T-Reste anschließen (Fig. 1). Als Nukleotid, an dem die Termination an TPhi stattfindet, wird der G-Rest bei Position 24209 angegeben (Dunn und Studier, 1983).

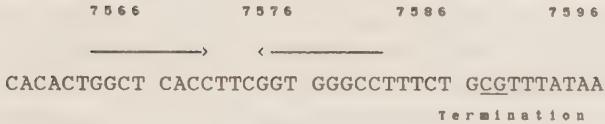
Die Termination der Transkription an TPhi findet *in vitro* auch mit gereinigter T7 RNA-Polymerase statt (Niles und Condit, 1975) und ist somit nicht von der Anwesenheit eines Protein-Faktors abhängig. Sie ist aber weder *in vitro* (Carter *et al.*, 1981), noch *in vivo* (McAllister *et al.*, 1981) vollständig effizient.

A



B

TE



TPhi

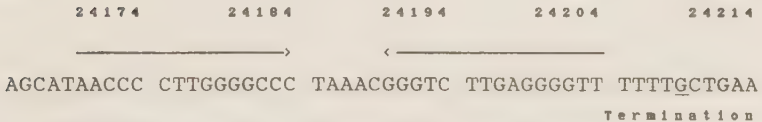


Fig. 1: Genom von T7 mit den Terminatoren TE und TPhi

A) Schematische Darstellung des T7 Genoms

Der Phage T7 besitzt ein lineares Genom von 39936 bp Länge. Es wird von links nach rechts transkribiert. Bei der frühen Transkription durch *E. coli* RNA-Polymerase, die an den Promotoren A1, A2 und A3 beginnt und am Terminator TE (7588, 7589) endet, erfolgt auch das Ablesen von Gen 1, der T7 RNA-Polymerase (3171-5822). Die Initiation der Transkription durch T7 RNA-Polymerase erfolgt an insgesamt 17 phagenspezifischen Promotoren wie z. B. Phi 10 (22903) oder Phi OR (39228). Rechts von Gen 10 (22966-24001) auf dem T7 Genom liegt der Terminator TPhi für die T7 RNA-Polymerase (Dunn und Studier, 1983).

B) Nukleotidsequenz der Terminatoren TE und TPhi

TE und TPhi besitzen die Struktur von klassischen *E. coli* Terminatoren: eine palindrome DNA-Sequenz (gekennzeichnet durch Pfeile), gefolgt von einer T-reichen Region (Dunn und Studier, 1983).

Eine Termination der Transkription durch T7 RNA-Polymerase wurde *in vitro* auch an T7 fremder DNA, wie dem *E. coli* Plasmid pBR322, beobachtet (Mc Allister *et al.*, 1981).

PROBLEMSTELLUNG

Bei dieser Arbeit sollte zunächst eine möglichst weitgehende Verkleinerung des zur Termination notwendigen Sequenzabschnitts von TPhi erreicht werden. Dazu mußte ein, aus zwei komplementären Oligonukleotiden bestehendes, synthetisches DNA-Fragment in ein Plasmid hinter einen Promotor für die T7 RNA-Polymerase eingebaut werden. Die Termination an diesem DNA-Fragment *in vitro* sollte unter verschiedenen Reaktionsbedingungen untersucht werden. Die Effizienz dieses synthetischen Terminators sollte auch mit einem längeren, die Terminationsstelle TPhi enthaltenden, Sequenzbereich aus dem T7 Genom verglichen werden. Weiterhin sollte die Auswirkung von Mutationen in der Nukleotidsequenz von TPhi auf die Termination untersucht werden.

Als nächste Fragstellung sollte geklärt werden, ob DNA-Fragmente mit einer von TPhi verschiedenen Nukleotidsequenz als T7 Terminatoren wirken können. Dies sollte zunächst an einer Region vom Ende des T7 Genoms untersucht werden, in der Golomb und Chamberlin (1974) einen T7 Terminator vermuteten. Außerdem sollte festgestellt werden, ob die Transkription durch T7 RNA-Polymerase auch an *E. coli* DNA-Fragmenten terminiert werden kann. Als Matrizen wurden dazu ein Bereich des *rmb* Operons mit den Terminatoren *rmb*-T1 und *rmb*-T2 (Brosius *et al.*, 1981) und das 3d^{rif} Fragment, das eine *rpoB* unabhängige Rifampicin-Resistenz vermittelt (Heinrich, 1987), verwendet.

Zur Durchführung dieser Experimente sollten all diese DNA-Fragmente in T7 Promotor-Plasmide eingebaut werden. Die Analyse der bei *in vitro* Transkription durch T7 RNA-Polymerase an den rekombinanten Plasmiden entstehenden RNA-Moleküle sollte durch Gelelektrophorese geschehen. Anschließend sollte die Position der gefundenen Terminationsstellen durch Interpolation oder - wenn möglich - sogar durch eine direkte Transkriptsequenzierung bestimmt werden.

Ziel dieser Untersuchungen war es, unterschiedliche T7 Terminatoren zu finden und deren Effizienz zu bestimmen, um dadurch einen Beitrag zur Aufklärung des Terminationsmechanismus bei T7 zu leisten.

Die Wirksamkeit von *in vitro* gefundenen und charakterisierten T7 Terminatoren sollte auch *in vivo* gezeigt werden. Als experimentelle Methode zum Nachweis von Terminations-Transkripten wurde die Northern-Hybridisierungstechnik gewählt. Bei diesen Versuchen *in vivo* wurden T7 Transkripte aus dem von Tabor und Richardson (1985) beschriebenen induzierbaren T7 Promotor/Polymerase System verwendet.

Abschließend sollte untersucht werden, ob die Anwesenheit eines Terminators eine messbare Auswirkung auf die Proteinbiosynthese in diesem T7 Expressionssystem besitzt.

Diese Fragestellung sollte durch Messung der Biosynthese von drei verschiedenen Proteinen beantwortet werden. Als Modellsysteme dienen das Tetracyclin-Resistenzprotein des Plasmids pBR322 (Backman und Boyer, 1983), die Chloramphenicol-Acetyltransferase des Plasmids pSV0-Cat (Gorman *et al.*, 1982) und das Protein Rif-IIb des *E. coli* Fragments 3d^{r1f} (Heinrich, 1987). Die Messung der Proteinsynthese sollte durch SDS-Gelelektrophorese, aber auch durch den Nachweis der biologischen Aktivität (Antibiotikum-Resistenz, immunchemische Bestimmung und Enzym-Aktivität) geschehen.

MATERIAL

1. BAKTERIENSTÄMME

Die *E. coli* Bakterienstämme JM83, JM105 und JM109 (Viera und Messing, 1982) wurden aus der Stammsammlung des Arbeitskreises Prof. Hartmann erhalten.

Die *E. coli* Stämme K38 (Russel und Model, 1984) und HMS174 (Campbell *et al.*, 1975) wurden von S. Tabor, Harvard Medical School, Cambridge, USA zur Verfügung gestellt.

2. NUKLEINSAUREN

Plasmide

Die Plasmide pBR322 (Bolivar *et al.*, 1977), pUC12 (Messing und Viera, 1982), pUC18, pUC19 (Yannish-Perron *et al.*, 1985) und pUC8-3d^{rf} (Heinrich, 1987) stammten vom Arbeitskreis Prof. Hartmann.

Das Plasmid pSV0-Cat (Gorman *et al.*, 1982) stammt von I. Kruczek, Arbeitskreis Prof. Fanning.

Der Expressionsvektor pKK223-3 wurde von Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg bezogen.

Die Plasmide pGP1-2 (Tabor und Richardson, 1985) in *E. coli* K38, pT7-4, pT7-5 und pT7-6 in *E. coli* HMS174 wurden von S. Tabor, Harvard Medical School, Cambridge, USA zur Verfügung gestellt.

Bakteriophagen-DNA

Die DNA des Phagen T7-D111 stammt vom Arbeitskreis Prof. Hartmann. Von Boehringer, Mannheim wurde DNA des Phagen Lambda und von New England Biolabs, Schwalbach wurden die DNA-Längenstandards PhiX 174/*HincII* und PhiX 174/*HaeIII* bezogen. Die Hydrolyse von Lambda-DNA mit *HindIII* bzw. *HindIII* und *EcoRI* wurde selbst durchgeführt. Die Länge der resultierenden DNA-Fragmente wurde aus dem Boehringer Katalog entnommen.

Oligonukleotide

Die Desoxyoligoribonukleotide t1 bis t8 wurden von R. Mertz, Genzentrum der Universität München, Martinsried mit dem DNA-Synthesizer 380 A der Firma Applied Biosystems hergestellt.

Die Primer (pUC-Universal und pUC-Revers) zur DNA-Sequenzierung wurden von Boehringer, Mannheim bezogen.

3. ENZYME

Restriktionsenzyme

Alle Restriktionsenzyme stammten von Boehringer, Mannheim, New England Biolabs, Schwalbach oder Renner GmbH, Dannstadt.

Weitere Enzyme

Von Boehringer, Mannheim stammten *E. coli* DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I, *E. coli* Chloramphenicol-Acetyltransferase, T4 DNA-Ligase, T4 Polynukleotid-Kinase, DNase I und RNase A aus Rinderpankreas, Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm, Proteinase K aus *T. album* und Lysozym aus Hühnereiweiß.

Die T7 RNA-Polymerase wurde von W. McAllister, State University New York, USA zur Verfügung gestellt.

4. NUKLEOTIDE

Amersham und Buchler, Braunschweig:

[α -³⁵S] thioATP (650 Ci/mMol); [α -³²P] dCTP (400 und 3000 Ci/mMol); [α -³²P] UTP (400 und 3000 Ci/mMol); [gamma-³²P] ATP (3000 Ci/mMol).

Boehringer Mannheim GmbH., Mannheim:

2'-Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP);
2',3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphate (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP);
Ribonukleosidtriphosphate (ATP, CTP, GTP, UTP).

Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg:

3'-Desoxyribonukleosidtriphosphate (3'dATP, 3'dCTP, 3'dGTP, 3'dUTP).

5. CHEMIKALIEN UND ANDERE MATERIALIEN

Außer den Standard-Chemikalien und Laborartikeln wurden im besonderen folgende Materialien verwendet:

Amersham und Buchler, Braunschweig:

L-[³⁵S]-Methionin (1250 Ci/mmol); [¹²⁵I]-Protein A; Hybond-N (Nylon) Membran und Rundfilter.

Atlanta GmbH., Heidelberg:

RNasin (Ribonukleaseinhibitor).

Bio 101, La Jolla, Ca., USA:

GeneClean™-Kit zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarose-Gel.

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim:

Acetyl-Coenzym A; 5-Brom-4-chlor-3-indoyl-β-D-galactosid (X-Gal); Chloramphenicol (CM); Dithiothreitol (DTT); Eichproteine für die SDS-Gelelektrophorese; Ethidiumbromid; Rifampicin; Rinderserum-Albumin; Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris).

Difco Laboratories, Detroit, USA:

Bacto-Agar; Bacto-Trypton; Bacto-Yeast-Extract.

GIBCO BRL GmbH, Eggenstein:

Formamid.

Janssen Chimica, Bersee, Belgien:

Aminoacetonitrilhydrogensulfat.

Merck AG, Darmstadt:

Ammoniumperoxidisulfat; Bromphenolblau; Calciumchlorid; Coomassie

Brillantblau R 250; Kieselgel 60F 254 DC-Platten; Kobalt-II-chlorid;
Magnesiumchlorid; Mangan-II-chlorid; Nickel-II-chlorid; Phenol;
Strontiumchlorid; Triton X-100; Xylencyanol; Zinkchlorid.

NEN Research Products, Boston, USA:
[Dichloroacetyl-1,2-¹⁴C]-Chloramphenicol.

Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg:
Q-Sepharose-FF.

Photo-Schaja, München:
Agfa-Gevaert-Fixierbad 334; Fuji-Röntgenfilm RX IF; Kodak-Röntgenfilm
X-Omat AR; Kodak-Entwickler D 19, Polaroid Schwarz-Weiß Film 107.

Rühl Chemie, Friedrichsdorf:
Cäsiumchlorid.

Schleicher und Schüll, Dassel:
DEAE-Cellulose-Membran NA-45; Nitrocellulose-Membran BA-85.

Serva, Heidelberg:
Acrylamid; Glaswolle (silanisiert); Dialyseschläuche; N,N'-Methylen-
bisacrylamid; Phenylmethylsulfonylfluorid; N,N,N',N'-Tetramethyl-
ethylendiamin; Spermidin·3HCl.

Sigma Chemie, München:
Agarose Typ II; Ampicillin; Dimethyldichlorsilan; Eichproteine für die SDS-
Gelelektrophorese (gefärbt); Kanamycin; Gamma-(methacryloxy)-
propyltrimethoxysilan; Nonidet P 40; Tetracyclin; Thiaminhydrochlorid.

6. GERÄTE

Beckman Instruments GmbH., München:
Ultrazentrifuge L8-70 mit Rotor VTI65; Microgenie™; DNA-
Sequenzprogramm. (Die Lokalisierung von Restriktionsschnittstellen und
die Längenbestimmung von Fragmenten erfolgte mit diesem Programm.)

Biometra GmbH, Göttingen:
Fast Blot Elektrophoreseapparatur.

Branson Sonic Power Company, Schwäbisch Gmünd:
Sonifier B12.

Gilford Instruments, Oberlin, Ohio, USA:
Spectrometer 260.

Hirschmann, München:
elscript 400 Densitometer. (Sofern bei der betreffenden Figur angegeben, erfolgte bei der Densitometrie eine quantitative Bestimmung der Bandenintensitäten durch Anwesenheit eines gleichen Standards auf jeder Spur).

Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA:
Slab Gel Dryer SE 1140.

IBM Deutschland GmbH:
Personalcomputer XT.

LKB, Gräfelfing:
Macrophor™ Sequenzierapparatur.

Microsoft GmbH, Taufkirchen:
Word 2.0, Textverarbeitungsprogramm.

Searle, Frankfurt:
Flüssigkeitsszintillationszähler Isocap 300.

Sorvall Instruments, Bad Nauheim:
Zentrifugen RC-5B und RC-5C.

METHODEN

1. VERMEHRUNG VON BAKTERIEN

1.1. Vermehrung auf Agarplatten

(nach Maniatis *et al.*, 1982)

Die Aufzucht von *E. coli* Einzelkolonien auf Platten geschah in LB-Agar-Medium - bei Bedarf - in Gegenwart eines Antibiotikums. Die Endkonzentration der Antibiotika betrug bei Ampicillin und Kanamycin 50 µg/mL und bei Rifampicin 30 µg/mL. Die Tetracyclin-Konzentration war unterschiedlich und ist immer bei den jeweiligen Experimenten angegeben.

1.2. Vermehrung in flüssigem Medium

(nach Maniatis *et al.*, 1982)

Die Aufzucht von *E. coli* in flüssigem Medium erfolgte durch Inkubation in LB-Medium bei 30°C oder 37°C.

1.3. Herstellung transformationskompetenter Zellen

(nach Maniatis *et al.*, 1982)

Die Herstellung von transformationskompetenten *E. coli* Bakterien der Stämme JM83, JM109 und K38/pGP1-2 erfolgte mit der CaCl₂-Methode.

1.4. Transformation von Bakterien

(nach Hanahan, 1983; modifiziert)

Die Transformation von Plasmid-DNA in die *E. coli* Bakterienstämme JM83 und JM109 geschah nach dem Standard-Verfahren.

Bei Transformation in *E. coli* K38/pGP1-2 Bakterien unterblieb der Hitzeschritt bei 42°C. Die nachfolgende Inkubationsdauer betrug 90 min bei 30°C.

Anschließend wurden LB-Agarplatten mit Aliquots von Transformationsansätzen beimpft.

1.5. Aufbewahrung von Bakterienstämmen

E. coli Bakterienstämme konnten für mehrere Tage in einer Flüssigkultur und mehrere Wochen lang auf einer Agarplatte bei 4°C aufbewahrt werden. Für längere Zeitspannen wurden sie als Flüssigkultur zusammen mit 30% Glycerin bei -20°C oder -70°C aufbewahrt.

2. ISOLIERUNG VON DNA

2.1. Reinigung von Oligonukleotiden

(nach Heinrich, 1987)

Die 50 bis 60 Basen langen Oligonukleotide t1 bis t8 wurden von R. Mertz mit einer DNA-Synthetisiermaschine hergestellt. Sie entstanden dabei nicht in reiner Form, sondern zusammen mit kürzeren Reaktions-Zwischenprodukten. Nach elektrophoretischer Auftrennung dieses Reaktionsgemisches (vgl. Meth., 5.4.) wurden die DNA-Banden im Gel durch Bestrahlung mit UV-Licht auf einer fluoreszenzbeschichteten Kieselgelplatte (Merck 60F 254) sichtbar gemacht. Die Bande mit der geringsten Mobilität wurde aus dem Gel eluiert und gereinigt (vgl. Meth. 2.5.). Durch Messung der Extinktion bei 260 nm wurde die Ausbeute bestimmt.

2.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* durch Schnellaufschluß

(nach Birnboim und Doly, 1979; modifiziert nach Heinrich, 1987)

Für die Präparation von kleinen Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden 10 mL Bakterien einer Übernachtskultur abzentrifugiert. Reste des Mediums

wurden durch Spülen mit bidest. H₂O entfernt. Die Bakterien wurden alkalisch lysiert, die weitere Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Behandlung mit RNase A, mehrmaliges Schütteln mit Phenol und Fällung mit Ethanol (vgl. Meth., 2.6.).

Eine nach diesem Verfahren angereicherte Plasmid-DNA konnte zur Identifizierung von rekombinanten Plasmiden, zur Isolierung von DNA-Fragmenten für eine Ligationsreaktion und zur DNA-Sequenzierung verwendet werden. Sie war jedoch nicht – vermutlich auf Grund der Behandlung mit RNase A – als Matrize für eine *in vitro* Transkription mit T7 RNA-Polymerase geeignet.

2.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* durch

CsCl-Gradientenzentrifugation

(nach Heinrich, 1987)

Bei der Anreicherung von Plasmid-DNA aus *E. coli* in größerem Maßstab geschah die Lysis der Bakterien durch 0,2% Triton X-100. Die weitere Reinigung der DNA erfolgte durch Zentrifugation in einem CsCl-Gradienten.

Die Ausbeute und Reinheit der Plasmid-DNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Die Aufbewahrung erfolgte in Aliquots bei -20°C.

Eine nach diesem Verfahren angereicherte Plasmid-DNA war ohne weitere Reinigungsprozedur für eine *in vitro* Transkription mit T7 RNA-Polymerase zu verwenden.

2.4. Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

DNA-Fragmente mit einer Länge größer als 0,5 kb wurden in einem nicht denaturierenden Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. Meth., 5.1). Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus diesen Agarose-Gelen wurden drei verschiedene Methoden angewendet.

Elektroelution an einer Dialysemembran

(nach Yang *et al.*, 1979; Schäffner, 1984)

Durch Elektroelution an einer Dialysemembran konnten DNA-Mengen bis 100 µg isoliert werden. Nach Elektrophorese in einem Agarose-Gel wurden die DNA-Banden durch Anfärben mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Vor der zu isolierenden Bande wurde ein 3 mm breiter Spalt aus dem Gel geschnitten, in den ein Dialyseschlauch eingeführt wurde.

Die Elektrophorese wurde (unter einer UV-Lampe) nun solange fortgesetzt, bis die DNA aus dem Gel, durch den Spalt bis an die Dialyse-Membran gewandert war. Dann wurde der Stromfluß 10 sec lang umgepolt, so daß sich die DNA im Spalt befand und dort abpipettiert werden konnte.

Die DNA wurde anschließend durch Extraktion mit Phenol und eine Ethanolfällung gereinigt.

Elution mit einer DEAE-Cellulose-Membran

(nach Gaastra und Jorgensen, 1984; modifiziert)

Dieses Verfahren wurde bei einer DNA-Menge von höchstens 1 µg angewandt. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente in einem Agarose-Gel und Sichtbarmachung der Banden durch Ethidiumbromid wurde in das Gel vor der zu isolierenden Bande ein Spalt geschnitten, in den eine DEAE-Cellulose-Membran gesteckt wurde. Dann wurde mit der Elektrophorese fortgefahren, bis die im UV-Licht sichtbare DNA-Bande an die DEAE-Cellulose-Membran gebunden hatte. Die Membran wurde aus dem Gel entfernt und anstatt in H₂O in NET-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA, 150 mM NaCl) gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte durch 45 minutiges Erhitzen bei 60°C in Hochsalz-NET-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA, 1 M NaCl). Das die DNA enthaltende Eluat wurde abgenommen und gereinigt (vgl. Meth., 2.6.).

Elution durch Bindung an Glassmilk™-Matrix

(nach Vogelstein und Gillespie, 1979)

Dieses Verfahren beruht auf einer Auflösung des Agarose-Gels durch Behandlung mit einer NaI-Lösung und der nachfolgenden Abtrennung der DNA durch Bindung an eine Silica-Matrix. Es wurde bei DNA-Mengen

bis zu 5 μg verwendet. Die Versuchsvorschrift ist dem Begleittext des GeneClean™-Kits zur Schnellisolierung von DNA entnommen.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das die gewünschte DNA-Bande enthaltende Gelstück zerteilt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 2,5 Volumina einer gesättigten NaI-Lösung (GeneClean™-Kit) und 5minütiger Inkubation bei 50°C löste sich die Agarose auf. Danach wurden 5 μL Glassmilk™-Suspension (GeneClean™-Kit) zugegeben und 5 min lang auf Eis gestellt, um eine Bindung der DNA an die Silica-Matrix zu ermöglichen. Der Überstand wurde nach Zentrifugation abgenommen, nochmals mit 5 μL Glassmilk™ behandelt und dann verworfen. Die Glassmilk™-Rückstände wurden vereinigt und dreimal mit jeweils 500 μL NEW-Puffer (GeneClean™-Kit) gewaschen. Zur Elution der DNA wurde die Glassmilk™ in 5 μL H₂O resuspendiert und 3 min lang bei 50°C inkubiert. Der Überstand mit der DNA wurde abpipettiert und die Silica-Matrix nochmals mit 5 μL H₂O inkubiert. Die DNA wurde dann ohne weitere Reinigung verwendet.

2.5. Isolierung von DNA aus Polyacrylamid-Gelen

(nach Maniatis *et al.*, 1982; modifiziert)

Die Isolierung von DNA-Fragmenten mit 50–500 bp Länge erfolgte aus Polyacrylamid-Gelen. Nach der Elektrophorese (Meth., 5.2.) wurden die DNA-Banden durch Färben mit Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht. Ein Gelstück mit der gewünschten Bande wurde zerkleinert und in einem Reaktionsgefäß mit 500 μL bidest. sterilem H₂O (statt Puffer) zur Elution über Nacht im Schüttler bei 37°C inkubiert.

Nach Zentrifugation wurde der Überstand abpipettiert, von Gelpartikeln gereinigt und zur Konzentrierung mit Ethanol gefällt.

2.6. Reinigung und Konzentrierung von DNA

(nach Maniatis *et al.*, 1982; modifiziert)

Die Abtrennung von Proteinen, besonders von Nukleasen aus Lösungen mit DNA geschah durch Schütteln mit Phenol/Chloroform (1:1) und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1).

Eine Entfernung von Salz und organischen Substanzen, sowie eine Konzentrierung von DNA-Lösungen erfolgte durch Fällung mit Ethanol bzw. Isopropanol.

3. ENZYMATISCHE REAKTIONEN AN DNA

3.1. Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

(nach Maniatis *et al.*, 1982; modifiziert)

Zur Hydrolyse mit einem Restriktionsenzym wurde die DNA (meist 1–10 µg) mit 1/10 Volumen des geeigneten 10fach konzentrierten Puffers versetzt. Bei sämtlichen Restriktionsspaltungen wurden – je nach Enzym – entweder Puffer mit niedriger, mittlerer oder hoher Ionenstärke verwendet. Bei einer Reaktion mit *Sma*I wurde der vom Lieferanten vorgeschlagene Puffer verwendet.

Bei einer Einfachspaltung wurden ca. 2–10 Einheiten des entsprechenden Restriktionsenzyms pro µg DNA verwendet. Die Spaltung einer DNA mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen wurde – sofern die Enzyme im gleichen Puffer aktiv waren – in einem Schritt durchgeführt. Die Dauer der Inkubation betrug von 3 bis 16 h bei 37°C.

3.2. Abspaltung der 5'-terminalen Phosphatgruppe

(nach Maniatis *et al.*, 1982; modifiziert)

Nach Spaltung mit einem Restriktionsenzym entstehen DNA-Moleküle mit einer Phosphat-Gruppe am 5'-Ende und einer OH-Gruppe am 3'-Ende. Eine Entfernung der 5'-Phosphatgruppe geschah durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm, um eine Rezirkularisierung von Plasmid-Vektoren bei einer nachfolgenden Ligation zu verhindern.

Dazu wurde ein Restriktionsansatz nach Ende der Inkubation direkt mit zwei Einheiten der alkalischen Phosphatase pro µg DNA versetzt und 1 h lang bei 37°C inkubiert.

Auch für die radioaktive Endarkierung von DNA-Fragmenten mußte die 5'-terminale Phosphatgruppe entfernt werden. Dazu wurde die in 50 mM

Tris-HCl pH 8.0 gelöste DNA mit 2 Einheiten alkalischer Phosphatase 1 h lang bei 37°C inkubiert.

Eine Inaktivierung der alkalischen Phosphatase geschah - sofern nötig - durch Schütteln mit Phenol.

3.3. Auffüllen von überhängenden 5'-Enden

(nach Maniatis *et al.*, 1982)

Durch Restriktionsspaltung entstehende DNA-Fragmente mit überhängenden 5'-Ende können mit dem Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I aufgefüllt werden. Dabei werden DNA-Moleküle mit glatten Enden erzeugt, was bei der Konstruktion von Plasmidvektoren gelegentlich notwendig war. Ein Reaktionsansatz enthielt ca. 1 µg DNA, je 1 µL einer 2,5 mM Lösung der 4 dNTPs, 1 Einheit Klenow-Polymerase und 2 µL 10fach konzentrierten Nick-Translationspuffer (500 mM Tris-HCl pH 7.2, 100 mM MgSO₄, 1 mM DTT, 500 µg/mL Rinderserum-Albumin) in einem Gesamtvolumen von 25 µL. Die Inkubation wurde 30 min lang bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.4. Ligation von DNA-Fragmenten

(nach Heinrich, 1987; modifiziert)

Die T4 DNA-Ligase kann 5'-Phosphat- und 3'-OH-Enden der DNA in Gegenwart von Mg²⁺ und ATP verknüpfen. Die bei einer Ligation verwendeten DNA-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese gereinigt, um das Entstehen von unerwünschten Klonen - bedingt durch unvollständige Restriktionsspaltung der DNA - auszuschließen.

Die Konzentration der eingesetzten DNA-Fragmente wurde nach Elektrophorese durch Färbung mit Ethidiumbromid und einen Intensitätsvergleich mit DNA-Banden von bekannter Konzentration in einem Bereich von 0,1 bis 1 µg ermittelt.

Ein Standard-Ligationsansatz enthielt in 10 µL Reaktionsvolumen 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 1 Einheit T4 DNA-Ligase, 50 ng Vektor-DNA und eine äquimolare Menge an Insert-DNA. Die Inkubationsdauer betrug 16 h bei 14°C.

Abweichend davon waren die Bedingungen bei Reaktionen, in denen synthetische Oligonukleotide oder DNA-Fragmente mit glatten Enden verwendet wurden. Bei einer Ligation mit Oligonukleotiden wurden diese jeweils in einem 20fachen molaren Überschuß zur Vektor-DNA eingesetzt.

Ein Ansatz zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit glatten Enden enthielt 4 Einheiten T4 DNA-Ligase und die Insert-DNA in dreifachem molaren Überschuß zur Vektor-DNA. Die Inkubation fand 48 h lang bei Raumtemperatur statt.

3.5. [^{32}P]-Markierung von DNA-Molekülen durch Nick-Translation

(Maniatis *et al.*, 1982; modifiziert)

Die Inkorporation von radioaktiven Nukleotiden in DNA zur Herstellung von Proben für eine Hybridisierungsreaktion erfolgte durch Nick-Translation. Die Reaktion wurde in zwei getrennten Schritten durchgeführt.

In einem Reaktionsvolumen von 30 μL wurden ca. 2 μg DNA mit 5 μL 10fach konzentriertem Nick-Translationspuffer (vgl. Meth., 3.3.) und 1,5 μL DNase I Lösung (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 10 min lang bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde durch 10minütiges Erhitzen auf 68°C die DNase zerstört.

Im zweiten Reaktionsschritt wurde [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$] dCTP in die DNA eingebaut. Zum Reaktionsansatz wurden 1,5 μL *E. coli* DNA-Polymerase I, je 1 μL 10 mM dATP, dGTP und dTTP, sowie 50 μCi [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$] dCTP mit einer spezifischen Aktivität von 3000 Ci/mmol gegeben. Nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion beendet. Die Inkorporation von [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$] dCTP in die DNA wurde durch Papierchromatographie mit Whatman 3MM-Papier in Fließmittel III (Weiß, 1985) kontrolliert. Dabei bleiben längerkettenige Nukleinsäuren wie DNA-Moleküle an der Auftragsstelle liegen, während das nicht inkorporierte dNTP nach oben (in Fließrichtung) wandert. Mit dem Flüssigkeitsszintillationszähler wurde dann direkt der Einbau von radioaktivem dCTP in die DNA bestimmt.

Eine Abtrennung des nicht inkorporierten [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$] dCTP vom Reaktionsgemisch war für die nachfolgende Hybridisierungsreaktion (vgl. Meth., 7.3) nicht erforderlich.

3.6. [^{32}P]-Endmarkierung von DNA-Fragmenten

(nach Maniatis *et al.*, 1982; modifiziert)

DNA-Fragmente mit einer freien OH-Gruppe am 5'-Ende können durch Phosphorylierung mit T4 Polynukleotidkinase radioaktiv markiert werden.

Eine Endmarkierung der synthetischen Oligonukleotide erfolgte zur Herstellung von radioaktiven Proben für eine Koloniehybridisierung (vgl. Meth., 4.2.). In einem Reaktionsvolumen von 10 μL waren 2,0 μM Oligonukleotid, 67 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM DTT, 3,0 μM [γ - ^{32}P] ATP (ca. 90 μCi) und 4 Einheiten T4 Polynukleotidkinase vorhanden. Der Ansatz wurde 30 min lang bei 37°C inkubiert. Der Einbau von [^{32}P] in das Oligonukleotid wurde direkt getestet. Dies geschah durch Papierchromatographie und Zählung der Radioaktivität an der Auftragsstelle (vgl. Meth., 3.5.). Eine Abtrennung des nicht inkorporierten [γ - ^{32}P] ATP vom Reaktionsgemisch war für die nachfolgende Hybridisierungs-Reaktion nicht erforderlich.

Durch Phosphorylierung mit [γ - ^{32}P] ATP wurden auch aus DNA-Fragmenten bekannter Länge radioaktive Marker für die Gelelektrophorese hergestellt. Dazu erfolgte eine Inkubation von 1 μg dephosphorylierter $\Phi\text{X } 174/\text{HaeIII}$ DNA (vgl. Meth., 3.2.), 67 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM DTT, 10 μCi [γ - ^{32}P] ATP und 4 Einheiten T4 Polynukleotidkinase in 10 μL Reaktionsvolumen 30 min lang bei 37°C. Diese Reaktionsmischung wurde nach Zugabe von 20 μL Formamid-Farbstoff-Puffer (vgl. Meth., 5.2.) durch 10minütiges Erhitzen bei 70°C und Abschrecken auf Eis denaturiert und sofort auf ein Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetragen.

3.7. DNA-Sequenzierung

(nach Heinrich, 1987; modifiziert)

Die Basenfolge der synthetischen Oligonukleotide t1 bis t8 sollte nach ihrer Herstellung durch DNA-Sequenzanalyse überprüft werden. Dazu wurden die jeweils zueinander komplementären Oligonukleotide in den Polylinkerbereich von pUC-Plasmiden kloniert (vgl. Meth., 6.1.). Auf diese Weise entstanden rekombinante Plasmide, auf denen sich Insertionen der aus jeweils zwei komplementären Oligonukleotiden bestehenden DNA-

Fragmente T, K, S1 bzw. S2 (vgl. Fig. 1) befinden. Die DNA-Sequenz dieser Insertionen wurde nach dem Didesoxy-Verfahren von Sanger *et al.* (1977) bestimmt.

Die hierfür erforderliche Plasmid-DNA wurde durch Schnellaufschluß aus transformierten JM83 Zellen gewonnen (vgl. Meth., 2.2.). Die Qualität der DNA wurde durch Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

Nach alkalischer Denaturierung und Hybridisierung des Primers an die DNA wurde Sequenzierungsreaktion mit dem Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I durchgeführt. An Stelle von dGTP wurde sein Substratanalogon 7-deaza-dGTP eingesetzt. Dadurch sollte die Ausbildung von Sekundärstrukturen in palindromen Sequenzbereichen der DNA während der Gelelektrophorese vermieden werden, die ein korrektes Ablesen der Basenfolge verhindern (Misuzawa *et al.*, 1986).

Die Auftrennung der Reaktionsprodukte durch Gelelektrophorese geschah wie in Meth., 5.4. beschrieben.

4. IDENTIFIZIERUNG REKOMBINANTER KLONE

4.1. Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA aus einem Schnellaufschluß

(nach Maniatis *et al.*, 1982)

Die Plasmid-DNA aus transformierten Bakterienkolonien wurde nach dem Schnellaufschluß-Verfahren (Meth., 2.2.) isoliert und mit geeigneten Restriktionsenzymen gespalten. Die Anwesenheit von gewünschten Insertionen wurde durch Elektrophorese in einem Agarose- oder Polyacrylamid-Gel in Gegenwart von DNA-Fragmenten bekannter Länge festgestellt.

4.2. Koloniehybridisierung

(nach Maniatis *et al.*, 1982; modifiziert)

Gelegentlich konnten durch das in Meth., 4.1. beschriebene Verfahren keine rekombinanten Klone identifiziert werden. Das geschah z.B. beim Einbau der DNA-Fragmente S1 und S2 in das Plasmid pT7-4 (vgl. Meth.,

6.1.) oder des DNA-Fragments T in das Plasmid pRif-4 (vgl. Meth., 6.4.). In diesen Fällen konnten rekombinante Klone durch Hybridisierung radioaktiv markierter Oligonukleotide gegen eine große Anzahl von Bakterienkolonien gefunden werden.

Dafür wurden die zu untersuchenden Kolonien auf zwei Agar-Platten in einem identischen Muster übertragen. Zusätzlich wurden diese Platten zur Kontrolle noch mit positiven (mit der richtigen Insertion in einem anderen Vektor) und negativen (ohne Insertion) Bakterienkolonien beimpft. Nach Inkubation bei 37°C bis zu einem Koloniedurchmesser von 1 bis 2 mm wurden die Bakterien von einer Platte auf ein Nylon- oder Nitrocellulose-Rundfilter transferiert.

Die Bakterien auf dem Filter wurden alkalisch lysiert und anschließend neutralisiert. Die DNA wurde durch 2ständiges Erhitzen bei 80°C auf der Membran fixiert.

Die Reaktionsbedingungen für die Hybridisierung wurden nach einer empirischen Formel von Meinkoth und Wahl (1984) ermittelt. Für radioaktive DNA-Proben mit 50 - 60 nt. Länge (entsprechend den verwendeten Oligonukleotiden) konnte danach eine Hybridisierung gegen die membrangebundene DNA in Gegenwart von 50% Formamid noch bis maximal 58°C erfolgen.

Nach 24ständiger Vorhybridisierung mit 40 mL einer Lösung aus 2x SSC (300 mM NaCl, 30 mM Na-Citrat), 0,1% SDS, 0,66% Magermilchpulver und 50% Formamid wurde die denaturierte radioaktive Probe (vgl. Meth., 3.6.) zur Membran gegeben und weitere 24 h bei 42°C inkubiert.

Das Waschen des Filters erfolgte unter stringenten Bedingungen 2x 20 min bei 65°C in 2x SSC, 0,1% SDS und 20 min in 0,1x SSC bei Raumtemperatur. Auf die Membran wurde ein Röntgen-Film aufgelegt, nach dessen Entwicklung Bakterienkolonien identifiziert werden konnten, die gegen das Oligonukleotid hybridisierten. Eine weitere Prüfung auf Vorhandensein der richtigen Insertion erfolgte durch Isolierung von Plasmid-DNA aus den positiven Klonen und Restriktionsspaltung (vgl. Meth., 4.1.).

5. ELEKTROPHORETISCHE TRENNMETHODEN

5.1. Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

(nach Maniatis *et al.*, 1982)

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten, die mehr als 500 bp lang waren, geschah durch Elektrophorese in horizontalen 0,8–1,2%igen Agarose-Gelen. Als Laufpuffer wurde 1x TBE-Puffer pH 8.3 (89 mM Tris, 89 mM Borsäure; 2mM EDTA) verwendet. Zum Einbringen in die Geltaschen wurden die Proben mit 1/2 Volumen Auftragspuffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 15% Ficoll, 0,25% Bromphenolblau) versetzt und gut durchmischt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in 1x TBE-Puffer mit 0,5 µg/mL Ethidiumbromid angefärbt, um die DNA-Banden im UV-Licht sichtbar zu machen.

5.2. Nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(nach Maniatis *et al.*, 1982)

Die Auftrennung von kleineren DNA-Fragmenten bis 1000 bp Länge geschah durch Elektrophorese in einem vertikalen 4–8%igem Polyacrylamid-Gel. Als Elektrophorese-Puffer wurde 1x TBE verwendet.

5.3. Agarose-Harnstoff Gelelektrophorese zur Auftrennung zellulärer RNA

(nach Schulze und Rödel, 1988; modifiziert)

Zur Auftrennung von zellulärer RNA aus *E. coli* Bakterien (vgl. Meth., 7) wurden vertikale Agarose-Harnstoff-Gele (1,6% Agarose und 6,5 M Harnstoff) mit 160 x 135 x 1,5 mm Größe eingesetzt. Als Puffer im Gel und bei der Elektrophorese wurde 1x RNA-Puffer (40 mM Tris, 720 mM NaH₂PO₄ und 2 mM EDTA) verwendet. Bei der Herstellung von Agarose-Harnstoff-Gelen wurde - wegen der Empfindlichkeit von RNA - ausschließlich mit frisch autoklavierten Lösungen und Gefäßen gearbeitet. Zunächst wurde ein 4,5%iges Polyacrylamid-Stützgel (5 mL) zwischen die Gelplatten gegossen. Dann wurden 0,45 g Agarose in 14 mL bidest. H₂O durch Aufkochen gelöst und unter Rühren mit 14 mL einer Lösung mit

2x RNA-Puffer und 13 M Harnstoff vereinigt. Nach Polymerisation des Stützgels wurde diese Lösung zwischen die Glasplatten gegossen. Das Gel wurde zum Erstarren über Nacht bei 4°C aufbewahrt.

Die RNA-Proben wurden vor dem Aufbringen denaturiert. Dies geschah durch Zugabe von einem Volumen Formamid-Farbstoff-Puffer (0,2% Bromphenolblau, 0,2% Xylencyanol in Formamid), 10minütigem Erhitzen bei 70°C und anschließendem Abschrecken auf Eis.

Die Elektrophorese wurde im Kühlraum durchgeführt, ihre Dauer betrug ca. 2 h bei 30 mA. Der Farbstoff Bromphenolblau sollte dabei nicht mehr als 2/3 des Gels durchwandert haben.

5.4. Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese in vertikalen Polyacrylamid-Harnstoff-Gelen wurde bei dieser Arbeit zu verschiedenen Zwecken eingesetzt. Als Laufpuffer wurde immer 1x TBE verwendet.

Trennung von Oligonukleotiden

(nach Heinrich, 1987)

Die Auftrennung der Reaktionsgemische nach der Synthese von Oligonukleotiden erfolgte in einem 15%igen Polyacrylamid-8 M Harnstoff-Gel. Die Proben wurden vor dem Aufbringen in 50% Formamid-Farbstoff-Puffer (vgl. Meth., 5.3.) 3 min lang bei 95°C erhitzt und anschließend auf Eis abgeschreckt. Die Dauer der Elektrophorese betrug ca. 3 h, bis der Farbstoff Bromphenolblau am unteren Rand des Gels angelangt war.

DNA-Sequenzierung

(nach Heinrich, 1987)

Auftrennung der Reaktionsprodukte einer DNA-Sequenzierungs-Reaktion (vgl. Meth., 3.7.) erfolgte in 6% Polyacrylamid-8 M Harnstoff-Gelen. Es wurde ein Keilgel gefahren mit einer Dicke von oben 0,2 mm und unten 0,5 mm. Die Elektrophorese wurde in einer thermostatisierten Apparatur bei 65°C durchgeführt. Die Proben wurden vor dem Auftrag in Formamid-Farbstoff-Puffer (vgl. Meth., 5.3.) 3 min bei 95°C erhitzt und auf Eis abgeschreckt. Die Elektrophorese bei 30 mA Stromstärke dauerte, bis der

Farbstoff Bromphenolblau am Ende des Gels angelangt war. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel von der Thermostatisierplatte entfernt, 15 min. lang in 10% Essigsäure gewaschen und 2 h bei 80°C getrocknet. Zur Autoradiographie wurde über Nacht ein Film bei Raumtemperatur aufgelegt.

Auftrennung von *in vitro* synthetisierten RNA-Molekülen

(nach Mosig, 1982; modifiziert)

Die Auftrennung von RNA-Molekülen, die bei einer *in vitro* Transkription mit T7 RNA-Polymerase entstanden waren (vgl. Meth., 8.1.), erfolgte durch Elektrophorese in 4 oder 8%igen Polacrylamid-8 M Harnstoff-Gelen. In der unteren Elektrophorese-Kammer befand sich zusätzlich 2 M Na-Acetat, um einen Ionengradienten zu erzeugen, der die Kompression von Banden mit hoher Mobilität bewirkt (Ausubel *et al.*, 1987). Die Proben wurden nach Denaturierung in 3 Volumina Formamid-Farbstoff-Puffer aufgebracht. Die Beendigung der Elektrophorese erfolgte, wenn das Bromphenolblau am Ende des Gels angelangt war. Nach Trennung der Gelplatten wurde das auf einer der Platten liegende Gel mit Plastikfolie unwickelt. Zur Autoradiographie wurde ein Film ca. 3 h lang bei -70°C aufgelegt.

RNA-Sequenzierung

(nach D'Allesio, 1982; modifiziert)

Die Produkte der RNA-Sequenzierungsreaktion (vgl. Meth., 8.2.) wurden in einem 10% Polyacrylamid-8,3 M Harnstoff-Gel aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde in einer thermostatisierten Apparatur bei 65°C durchgeführt. Das Aufbringen der Proben erfolgte nach Denaturierung in 50% Formamid-Farbstoff-Puffer. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn der Farbstoff Xylencyanol ca. 80% des Gels durchwandert hatte. Die Autoradiographie eines RNA-Sequenz-Gels erfolgte wie bei einem Transkriptions-Gel beschrieben.

5.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen (nach Laemmli *et al.*, 1970)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in vertikalen 1,5 mm dicken Polyacrylamid-SDS-Gelen. Ein Gel zur elektrophoretischen Analyse von Proteinen bestand aus 2 Komponenten, dem unteren Trenngel mit einem Volumen von 34 mL (13% Polyacrylamid, 0,1% SDS, 330 mM Tris-HCl pH 8.7) und dem oberen Sammelgel mit einem Volumen von 6 mL (8,5% Polyacrylamid, 0,1% SDS, 200 mM Tris-HCl pH 6.8). Als Elektrolyse-Puffer diente 1x TG (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS). Die Proben wurden mit dem gleichen Volumen Protein-Lysis-Puffer (65 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% Glycerin, 3,5% SDS, 5% β -Mercapto-Ethanol, 0,1% Bromphenolblau) 3 min lang bei 95°C erhitzt und dann auf das Gel aufgebracht. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn das Bromphenolblau das Ende des Gels erreicht hatte.

Anschließend wurde das Gel 5 min lang mit Coomassie-Lösung (0,2% Coomassie Brilliantblau, 50% Methanol, 7% Essigsäure) angefärbt. Nach mehrstündigem Entfärben in 30% Methanol, 7% Essigsäure zur Sichtbarmachung der Proteinbanden wurde das Gel getrocknet. Bei Verwendung von radioaktiven Proben wurde ein Röntgenfilm über Nacht bei Raumtemperatur aufgelegt.

6. KONSTRUKTION VON PLASMID-VEKTOREN

6.1. Vektoren mit synthetischen DNA-Fragmenten

Die komplementären synthetischen Oligonukleotide t1 (50 b) und t2 (58 b) ergeben zusammen das DNA-Fragment T, das an seinen Enden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Eco*RI und *Sac*I besitzt (Fig. 1). Um die Nukleotidsequenz nach der Synthese zu kontrollieren, wurden t1 und t2 in einen *Eco*RI und *Sac*I geschnittenen pUC18 Vektor (Yannish-Perron *et al.*, 1985) kloniert und in den *E. coli* Stamm JM83 transformiert. Dabei wurde ein rekombinantes Plasmid pUC18T erhalten, das – im Gegensatz zu pUC18 (Fig. 3, Spur 1) – eine Insertion von ca. 60 bp Länge zwischen den Schnittstellen für *Eco*RI und *Sac*I besitzt (Fig. 3, Spur 2).

T		SacI				EcoRI			
		10	20	30	40	50	60	70	80
	t1	5'-	CAGCAT	AACCCCTTGG	GGCCTCTAAA	CGGGTCTTGA			
	t2	3'-	TCGAGTCGTA	TTGGGGAACC	CCGGAGATTT	GCCCAGAACT			
	t1		GGGGTTTTTT	GCTG	-3'				
	t2		CCCCAAAAAA	CGACTTAA	-5'				
K		PstI				HindIII			
		10	20	30	40	50	60	70	80
	t3	5'-	GTCGTA	TTGGCCAACC	CCGGAGATTT	GCCCAGAACT			
	t4	3'-	ACGTCAGCAT	AACCGGTTGG	GGCCTCTAAA	CGGGTCTTGA			
	t3		CCCCAAAAAA	CGACTA	-3'				
	t4		GGGGTTTTTT	GCTGATTCTGA	-5'				
S1		SacI				EcoRI			
		10	20	30	40	50	60	70	80
	t5	5'-	CAGCAT	AACCCCTCGG	GGCCCCCTAAA	CGGGCCCCGA			
	t6	3'-	TCGAGTCGTA	TTGGGGAGCC	CCGGGAGATTT	GCCCCGGGCT			
				*	*	*	*	*	*
	t5		GGGGTTTTTT	GCTG	-3'				
	t6		CCCCAAAAAA	CGACTTAA	-5'				
S2		SacI				EcoRI			
		10	20	30	40	50	60	70	80
	t7	5'-	CAGCAA	AACCCCTTGG	GGCCTCTAAA	CGGGTCTTGA			
	t8	3'-	TCGAGTCGTT	TTGGGGAACC	CCGGAGATTT	GCCCAGAACT			
			*						
	t7		GGGGTTTTTT	TTGCTG	-3'				
	t8		CCCCAAAAAA	AACGACTTAA	-5'				

Fig. 2: DNA-Sequenz der aus komplementären Oligonukleotiden bestehenden synthetischen Fragmente T, K, S1 und S2

Das DNA-Fragment T besteht aus t1 (50 b) und t2 (58 b), wird von Schnittstellen für *EcoRI* und *SacI* begrenzt und enthält den Bereich von 24164 bis 24214 aus dem T7 Genom.

Das DNA-Fragment K besteht aus t3 (52 b) und t4 (60 b), wird von Schnittstellen für *HindIII* und *PstI* begrenzt und ist zur Basenfolge des Fragment T transvers.

Das aus t5 (50 b) und t6 (58 b) bestehende Fragment S1 entstand durch Ersetzen der TA-Basenpaare bei T an den Positionen 18, 25, 35, 37 und 38 (*) durch CG-Basenpaare.

Bei dem aus t7 (52 b) und t8 (60 b) bestehenden Fragment S2 wurde das bei T an Position 10 befindliche TA-Basenpaar durch ein AT-Basenpaar (*) ausgetauscht. Außerdem erfolgte die Insertion von 2 TA-Basenpaaren an Position 51 und 52.

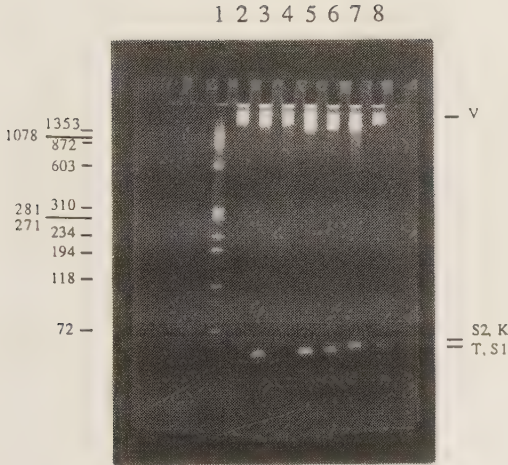


Fig. 3: Restriktionsspaltung von pUC18, pUC18T, pT7-4, pT7-4T, pT7-4S1, pT7-4S2 und pT7-5K

Die Plasmide pUC18 (2), pUC18T (3), pT7-4 (4), pT7-4T (5), pT7-4S1 (6) und pT7-4S2 (7) wurden mit *EcoRI* und *SacI* hydrolysiert. Das Plasmid pT7-5K (8) wurde mit *HindIII* und *PstI* geschnitten. Als Längenstandard diente PhiX174/*HaeIII* DNA (1).

Auf allen Spuren sind die Banden des Vektors (V) knapp unterhalb der Auftragsstelle zu sehen. Bei (2) und (4) wird keine Insertion gefunden. Bei (3) und (5) ist das Fragment T mit 58 bp, bei (6) das Fragment S1 mit 58 bp, bei (7) das Fragment S2 mit 60 bp und bei (8) das Fragment K ebenfalls mit 60 bp Länge zu erkennen.

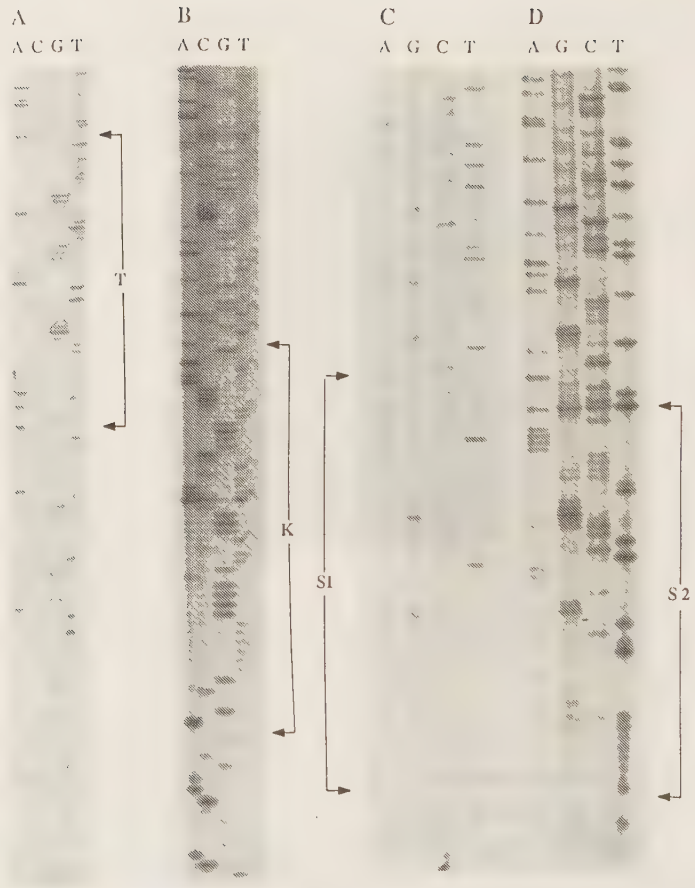


Fig. 4: Durch Plasmidsequenzierung ermittelte Basenfolge der Insertionen in pUC18T, pUC12K, pUC19S1 und pUC19S2

Legende von Fig. 4:

Die Basenfolge der Insertionen war - soweit lesbar - identisch mit der Nukleotidsequenz der DNA-Fragmente T, K, S1 und S2 (vgl. Fig. 2).

A) DNA-Sequenz der Insertion T (fett) aus pUC18T. Die Restriktionsstellen für *Eco*RI (GAATTC) und *Sac*I (GAGCTC) sind unterstrichen. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem pUC-Universal-Primer durchgeführt.

5' - ATCCCCGGGT ACCGAGCTCA GCATAACCCC TTGGGGCCTC
TAAACGGGTC TTGAGGGGTT TTTTGCTGAA TTC -3'

B) DNA-Sequenz der Insertion K (fett) aus pUC12K. Die Restriktionsstellen für *Hind*III (AAGCTT) und *Pst*I (CTGCAG) sind unterstrichen. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem pUC-Universal-Primer durchgeführt.

5' - CAAGCTTAGT CGTTTTTGG GGAGTCTGG GCAAATCTCC
GGGGTCCCC AATACGACTG CAG -3'

C) DNA-Sequenz der Insertion S1 (fett) aus pUC19S1. Die Restriktionsstelle für *Sac*I (CTCGAG) ist unterstrichen. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem pUC-Reverse-Primer durchgeführt. Nicht eindeutig lesbare Nukleotide sind kursiv dargestellt.

5' - TTTTTTGGGG AGCCCCGGGC AAATCCCCGG GGCTCCCCAA
TACGACTCGA GCCATGGGCC CC -3'

D) DNA-Sequenz der Insertion S2 (fett) aus pUC19S2. Die Restriktionsstelle für *Sac*I (CTCGAG) ist unterstrichen. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem pUC-Reverse-Primer durchgeführt. Nicht eindeutig lesbare Nukleotide sind kursiv dargestellt.

5' - CGTTTTTTTT GGGGAGTTCT GGGCAAATCT CCGGGGTTCC
CCAAAACGAC TCGAGCCAAT GGG -3'

Die Basenfolge der Insertion in pUC18T wurde durch Sequenzanalyse bestimmt (vgl., Meth. 3.7.). Die DNA-Sequenz der Insertion T von pUC18T (Fig. 3) war mit der erwarteten Sequenz des DNA-Fragments T identisch (vgl. Fig. 2 und 4). Daraufhin wurde das Plasmid pUC18T mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *SacI* gespalten, die 58 bp lange Insertion T aus einem Polyacrylamid-Gel (vgl. Meth., 2.5.) isoliert und in den ebenfalls mit *EcoRI* und *SacI* geschnittenen T7 Vektor pT7-4 (Fig. 5) kloniert (Fig. 6A).

Das 2388 bp lange Plasmid pT7-4 besitzt - wie auch pT7-5 und pT7-6 (Fig. 5) - den T7 Promotor Phi 10, dahinter einen Polylinkerbereich, den ColE1 "Origin of Replication" und das Gen für die β -Lactamase aus pBR322 (S. Tabor, pers. Mitt.). pT7-5 und pT7-6 unterscheiden sich von pT7-4 durch die Orientierung des β -Lactamase Gens. In pT7-6, einem 2208 bp langen Plasmid, besitzt der Polylinkerbereich dieselbe Orientierung wie in pT7-4, während im 2404 bp langen Plasmid pT7-5 die Orientierung des Polylinkers - im Vergleich zu pT7-4 und pT7-6 - umgekehrt ist (Fig. 5). Bei der Klonierung des Fragments T in pT7-4T wurde ein rekombinantes Plasmid pT7-4T (Fig. 6) mit einer Insertion erhalten, die bei Spaltung mit *EcoRI* und *SacI* wie das Fragment T aus pUC18T wandert (Fig. 3, Spur 3). Dagegen ist bei Hydrolyse des Plasmids pT7-4 mit *EcoRI* und *SacI* keine Insertion zu sehen (Fig. 3, Spur 4).

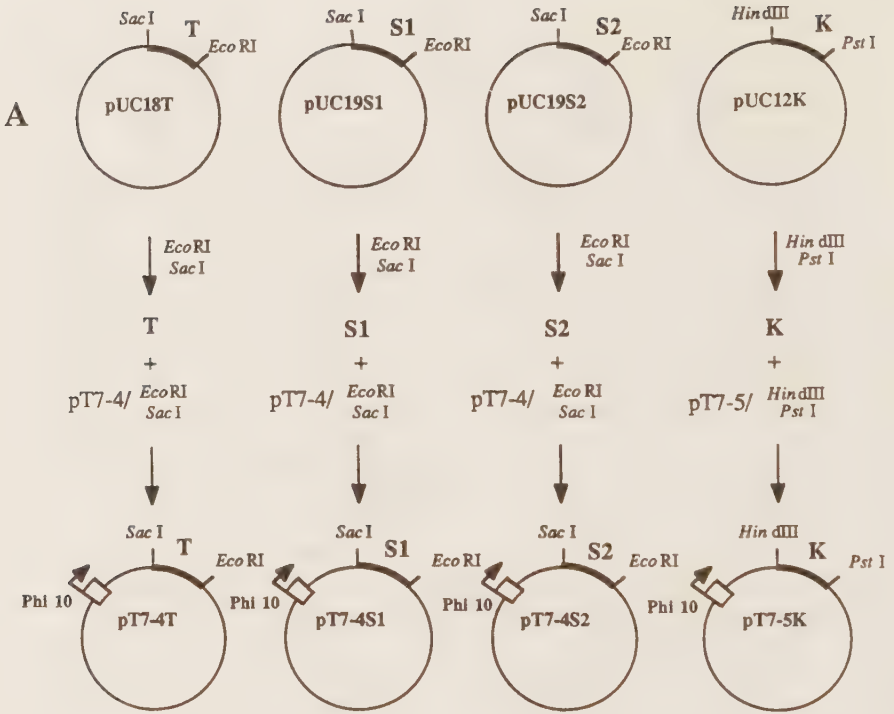
Die jeweils zueinander komplementären Oligonukleotide t3 (52 b) und t4 (60 b), t5 (50 b) und t6 (58 b) bzw. t7 (52 b) und t8 (60 B) ergeben - entsprechend wie bei T - die DNA-Fragmente K, S1 oder S2 (Fig. 2). S1 und S2 besitzen - wie T - an ihren Enden *EcoRI* bzw. *SacI* Schnittstellen, während sich an den Enden des Fragments K Schnittstellen für die Enzyme *HindIII* und *PstI* befinden.

Die Fragmente S1 und S2 wurden in einen mit *EcoRI* und *SacI* gespaltenen pUC19 Vektor (Yannish-Perron *et al.*, 1985) kloniert, während das Fragment K in einen mit *HindIII* und *PstI* gespaltenen pUC12 Vektor (Viera und Messing, 1982) kloniert wurde. Die Basenfolge der Insertionen in den rekombinanten Klone pUC19S1, pUC19S2 und pUC12K wurde durch DNA-Sequenzierung bestimmt (vgl. Meth., 3.7.). Dabei wurde gefunden, daß - wie bereits bei T - die Sequenz der Insertionen in den rekombinanten Plasmiden mit der erwarteten DNA-Sequenz der Fragmente S1, S2 und K übereinstimmt (vgl. Fig. 2 und 4).



Fig. 5: Schematische Darstellung der Plasmide pT7-4, pT7-5 und pT7-6

pT7-4, pT7-5 und pT7-6 sind T7 Vektoren. Sie enthalten den T7 Promotor Phi 10, einen Polylinkerbereich, das für die Ampicillinresistenz verantwortliche β -Lactamase Gen (Ap^r) und den Col E1 "Origin of replication". Die Orientierung des Polylinkers in pT7-5 ist gegenüber pT7-4 und pT7-6 umgekehrt. Die Orientierung des β -Lactamase Gens in pT7-5 und pT7-6 ist unterschiedlich gegenüber pT7-4 (S. Tabor, pers. Mitt.). Die RNA-Synthese an Phi 10 startet bei pT7-4 an Position 57, bei pT7-5 an Position 92 und bei pT7-6 an Position 87 im Uhrzeigersinn.



B

Promotorbereich (Phl 10) GACTCACTAT AGGGAGACCC AAGCTTGGGC ...
 RNA-Synthese-Start

Insertionsstellen der Fragmente T, K, S1 und S2

	<i>SacI</i>		<i>EcoRI</i>
pT7-4T	.. <u>GAGCTC</u> AGCA TAACCCCTTG ...	GGTTTTTTTGC	<u>TGAATTC</u> TT..
	<i>PstI</i>		<i>HindIII</i>
pT7-5K	.. <u>CTGACG</u> TCGT ATTGGGGAAC ...	CCAAAAACG	ACT <u>AAGCTT</u> ..
	<i>SacI</i>		<i>EcoRI</i>
pT7-4S1	.. <u>GAGCTC</u> AGCA TAACCCCTCG ...	GGTTTTTTTGC	<u>TGAATTC</u> TT..
	<i>SacI</i>		<i>EcoRI</i>
pT7-4S2	.. <u>GAGCTC</u> AGCA AAACCCCTTG ...	GGTTTTTTTTT	GCT <u>GAAATC</u> ..

Fig. 6: Konstruktion der Plasmide pT7-4T, pT7-4S1, pT7-4S2 und pT7-5K

Legende von Fig. 6:

A) Konstruktionsschema

Die Plasmide pUC18T, pUC19S1 und pUC19S2 wurden mit *EcoRI* und *SacI* gespalten. Die Insertionen T, S1 und S2 wurden als *EcoRI/SacI* Fragmente in den Vektor pT7-4 eingebaut. Dabei entstanden die rekombinanten Plasmide pT7-4T, pT7-4S1 und pT7-4S2.

Das *HindIII/PstI* DNA-Fragment K aus pUC12K wurde in den Vektor pT7-5 eingebaut. Dabei entstand das rekombinante Plasmid pT7-5K.

B) Nukleotidsequenz in Promotor- und Insertionsbereich

Die RNA-Synthese am Promotor Phi 10 startet bei allen Plasmiden mit der Basenfolge pppGpGpG. Die Nukleotidsequenz eines Transkripts entspricht der Basenfolge des dargestellten DNA-Strangs.

Dabei wird ersichtlich, daß ein Transkript an pT7-5K innerhalb der Insertion K genau die transverse Basenfolge zu einem Transkript an pT7-4T innerhalb der Insertion T besitzt.

Die Basenfolge der Transkripte an pT7-4S1 und pT7-4S2 hingegen sollte - abgesehen von den Basenaustauschen und/oder Insertionen (vgl. Fig. 2) - entsprechend der Sequenz eines Transkripts an pT7-4T sein.

Das Fragment K wurde aus pUC12K durch Hydrolyse mit *HindIII* und *PstI* isoliert und in das mit *HindIII* und *PstI* geschnittene Plasmid pT7-5 kloniert. Das dabei gefundene rekombinante Plasmid pT7-5K (Fig. 6A) enthält eine Insertion, die auf dem Gel etwas langsamer wandert als T (Fig. 3, Spur 7). Dieser Befund ist erklärbar, da die Insertion K von der DNA-Sequenz her um 2 Nukleotide länger als T ist (vgl. Fig. 2).

Entsprechend wurden auch die DNA-Fragmente S1 und S2 nach Restriktionsspaltung von pUC19S1 und pUC19S2 mit *EcoRI* und *SacI* isoliert und in pT7-4 kloniert. Die rekombinanten Plasmide pT7-4S1 und pT7-4S2 (Fig. 6A) konnten durch eine Koloniehybridisierung gegen die am 5'-Ende mit [³²P] markierten Oligonukleotide t5 bzw. t7 identifiziert werden (vgl. Meth., 4.2.). Das Plasmid pT7-4S1 besitzt eine Insertion mit der Länge des Fragments T (Fig. 3, Spur 5), während pT7-S2 eine - entsprechend der DNA-Sequenz von S2 (vgl. Fig. 2) - um 2 Basen längere Insertion aufweist (Fig. 3, Spur 6).

6.2. Vektoren mit Fragmenten aus T7-DNA

Eine Hydrolyse von T7 DNA mit dem Restriktionsenzym *ClaI* ergibt 4 Fragmente von 22855 (A), 9980 (B), 4243 (C) und 2858 (D) bp Länge (Fig. 7A 2). Der späte T7 Terminator TPhi, der von der T7 RNA-Polymerase erkannt wird, befindet sich auf dem Fragment *Cla* C zwischen

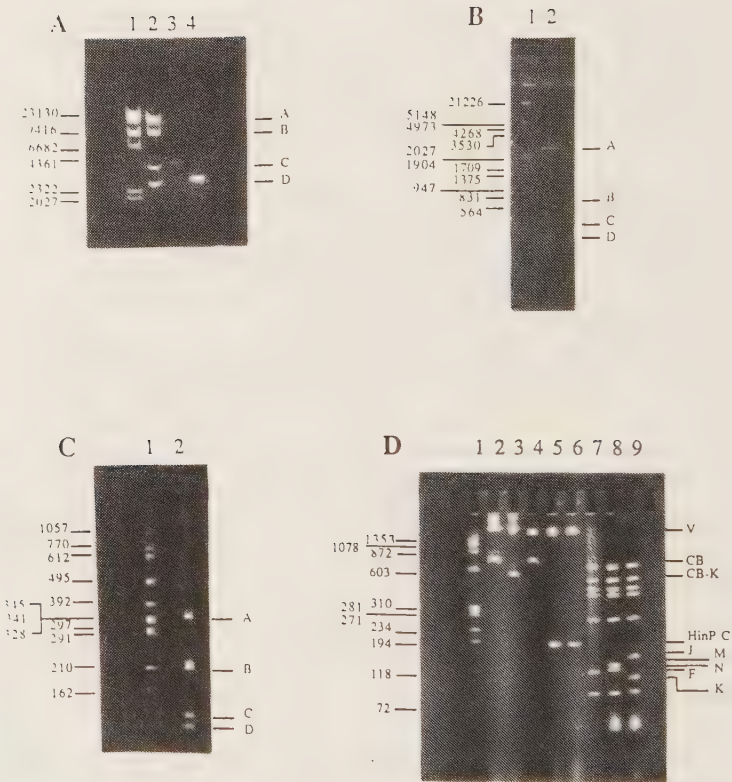


Fig. 7: Restriktionsspaltungen von T7-DNA und den Plasmiden pUC18CB, pT7-4CB, pT7-4TPhiR und pT7-4TPhiL

Legende von Fig. 7:

A) Bei Hydrolyse von T7 DNA mit *Cla*I (2) entstanden 4 DNA-Fragmente A (ca. 20 kb), B (ca. 10 kb), C (ca. 4 kb) und D (ca. 3 kb). Die Fragmente T7-*Cla* C (3) und T7-*Cla* D (4) wurden aus einem Agarose-Gel isoliert.

Als Längenstandard (1) wurde Lambda/*Hind*III DNA verwendet.

B) Bei Spaltung von T7-*Cla* C mit *Hpa*II (2) entstanden die Fragmente A (2,4 kb), B (0,75 kb), C (0,3 kb) und mehrere kleinere Fragmente (D), die nicht aufgetrennt werden konnten (vgl. Fig. 8A).

Als Längenstandard (1) diente Lambda/*Eco*RI + *Hind*III DNA.

C) Eine Hydrolyse des 792 bp langen *Eco*RI/*Hind*III DNA-Fragments T7-*Cla* C/*Hpa* B aus pUC18-CB (Fig. 9A) mit *Hin*PI (2) ergab die Fragmente A (350 bp), B (210 bp), C (130 bp) und D (110 bp).

Als Längenstandard (1) wurde PhiX174/*Hinc*II DNA verwendet.

D) Bei Spaltung der Plasmide pUC18CB (2) und pT7 4CB (4) mit *Eco*RI und *Hind*III wurde neben der Bande des Vektors (V) eine 800 bp lange Insertion CB gefunden.

Zur Bestimmung der Orientierung von CB in pUC18CB wurde das Plasmid mit *Kpn*I hydrolysiert (3). Dabei war neben dem Vektor (V) ein DNA-Fragment von ca. 600 bp Länge (CB-K) zu sehen (Erläuterungen siehe Fig. 8C).

Eine Spaltung von pT7-4TPhiL (5) und pT7-4TPhiR (6) mit *Eco*RI und *Hind*III ergab neben der Bande des Vektors (V) eine Insertion *Hin*P C mit ca. 180 bp Länge.

Bei Restriktionsschnitt von pT7-4 mit *Hae*III (7) waren 7 Fragmente zu erkennen, darunter das Fragment F (112 bp). Die Hydrolyse der Plasmide pT7-4TPhiL und pT7-4TPhiR zur Bestimmung der Orientierung von *Hin*P C mit *Hae*III ergab bei pT7-4TPhiL (8) anstatt F zwei Fragmente L (120 bp) und M (115 bp), sowie bei pT7-4TPhiR (9) zwei Fragmente J (140 bp) und K (100 bp) (Erläuterungen siehe Fig. 9C).

Als Längenstandard (1) wurde PhiX174/*Hae*III DNA verwendet.

den Nukleotiden 22856 und 27098 des T7 Genoms (Dunn und Studier, 1983). Der Versuch einer Klonierung des 4,2 kb langen Fragments *Cla* C in den mit dem - zu *Cla*I kompatiblen - Restriktionsenzym *Acc*I geschnittenen Vektor pUC18 war erfolglos.

Durch Spaltung von T7-*Cla* C mit dem Enzym *Hpa*II entstehen 8 Fragmente von 2403 (A), 742 (B), 337 (C), 202 (D), 190 (E), 188 (F), 173 (G) und 9 (H) bp Länge (Fig. 7B 2 und 8A). Auf dem 742 bp langen Fragment B von Position 23566 bis 24308 des T7 Genoms liegt die Terminationsstelle TPhi (Dunn und Studier, 1983). Das Fragment T7-*Cla* C/*Hpa* B wurde isoliert (Fig. 7 B2) und in das mit *Acc*I geschnittene Plasmid pUC18 kloniert.

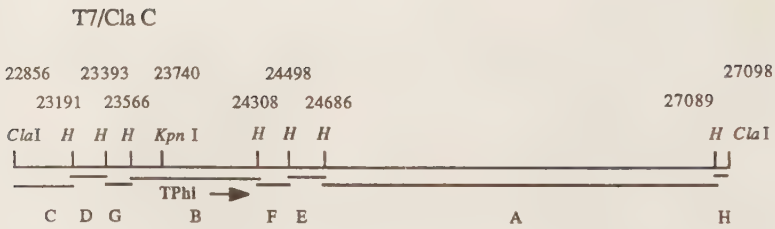
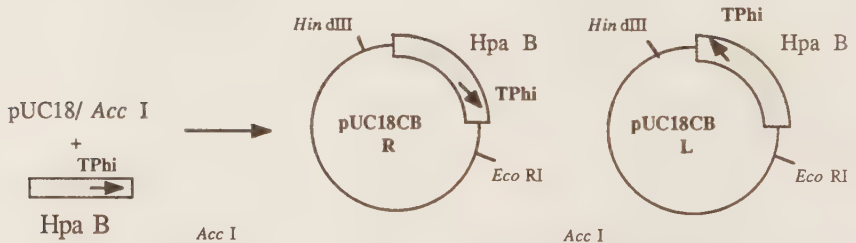
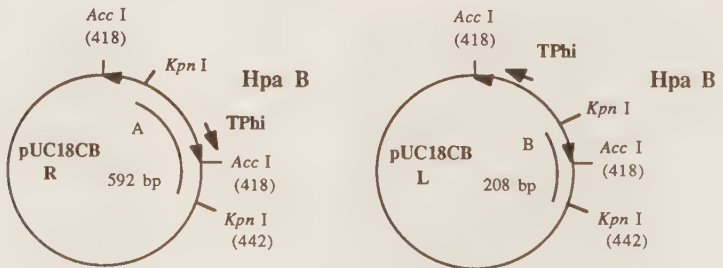
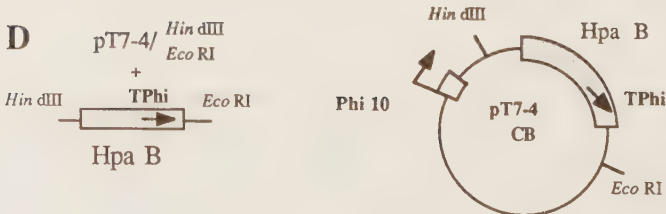
A**B****C****D**

Fig. 8: Konstruktion der Plasmide pUC18CB und pT7-4CB

Legende von Fig. 8:

A) Schematische Darstellung von T7-*Cla* C

T7-*Cla* C reicht von Position 22856 bis 27098 auf dem T7 Genom und enthält die Terminationsstelle von TPhi (Dunn und Studier, 1983). Auf T7-*Cla* C befinden sich 7 Schnittstellen für *Hpa*II (*H*) an den Positionen 23191, 23393, 23556, 24403, 24498, 24686 und 27089 des T7 Genoms. Bei Hydrolyse von *Cla* C mit *Hpa*II entstehen die Fragmente A (2403 bp), B (742 bp), C (337 bp), D (202 bp), E (190 bp), F (188 bp), G (173 bp) und H (9 bp).

Auf dem Subfragment T7-*Cla* C/*Hpa* B (23556 bis 24403) befindet sich TPhi und eine Schnittstelle für *Kpn*I an Position 23740.

B) Klonierung von T7-*Cla* C/*Hpa* B in pUC18

Das Plasmid pUC18 wurde mit *Acc*I linearisiert und mit alkalischer Phosphatase behandelt. Da bei Hydrolyse mit *Hpa*II bzw. *Acc*I entstehende DNA-Fragmente kompatible Enden besitzen, konnte *Cla* C/*Hpa* B in diesen Vektor eingebaut werden. Im rekombinanten Plasmid pUC18CB kann die Insertion in zwei Orientierungen (R und L) vorliegen.

C) Bestimmung der Orientierung von T7-*Cla* C/*Hpa* B in pUC18CB

Auf pUC18 befindet sich eine Schnittstelle für *Kpn*I an Position 442. Das Fragment T7-*Cla* C/*Hpa* B befindet sich in der Schnittstelle für *Acc*I an Position 418 von pUC18. Eine Hydrolyse von pUC18CB-R mit *Kpn*I ergibt ein Fragment A mit 592 bp Länge. Bei Spaltung von pUC18CB-L entsteht hingegen ein Fragment B mit 208 bp Länge.

D) Klonierung von T7-*Cla* C/*Hpa* B in pT7-4

Das *Eco*RI/*Hind*III Fragment T7-*Cla* C/*Hpa* B aus pUC18CB-R (Fig. 9A) wird in den mit *Eco*RI und *Hind*III geschnittenen Vektor pT7-4 eingebaut. Auf Grund dieser asymmetrischen Klonierung stimmt die Orientierung des Terminators TPhi auf *Cla* C/*Hpa* B in pT7-4CB bezüglich des T7 Promotors Phi 10 mit der Orientierung auf dem T7 Genom (Pfeilrichtung) überein.

Es wurde ein rekombinantes Plasmid pUC18CB mit einer Insertion von ca. 800 bp Länge im Polylinkerbereich gefunden (Fig. 7D 2).

Da bei einem Fragment mit zwei gleichartigen Enden der Einbau in beiden Richtungen erfolgen konnte, mußte die Orientierung von T7-*Cla* C/*Hpa* B in pUC18CB ermittelt werden. Bei Position 23740 auf dem T7 Genom liegt eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Kpn*I, die das 742 bp lange Fragment T7-*Cla* C/*Hpa* B in 2 verschieden lange Abschnitte unterteilt (Fig. 8A). Im Polylinkerbereich von pUC18 befindet sich ebenfalls eine Schnittstelle für *Kpn*I bei Position 442, während die Schnittstelle für *Acc*I, in die das T7 Fragment einkloniert wurde, bei Position 418 von pUC18 liegt (Fig. 8C). Bei einer *Kpn*I-Spaltung des rekombinanten Plasmids entstehen somit zwei Fragmente.

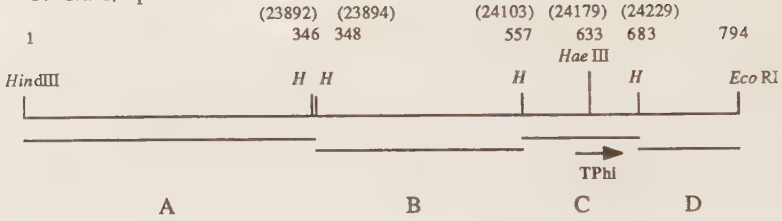
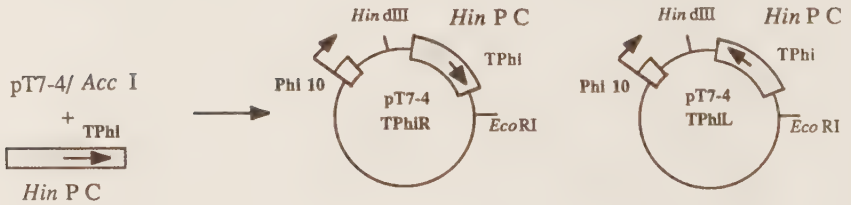
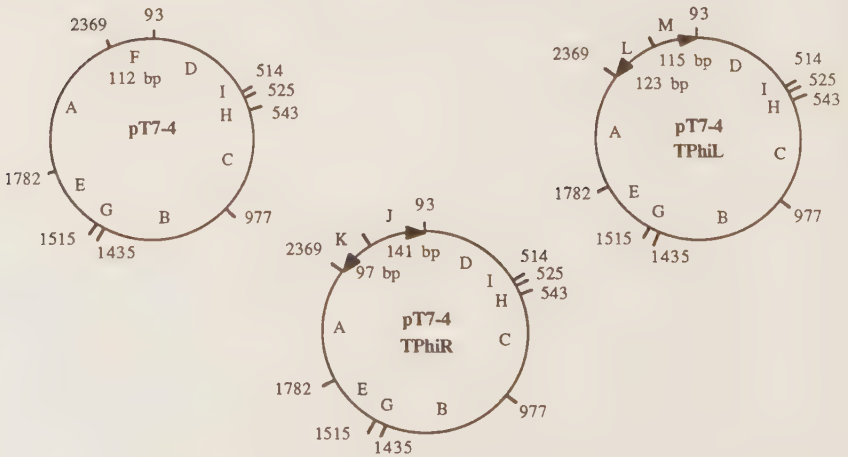
A T7-Cla C/Hpa B**B****C**

Fig. 9: Konstruktion der Plasmide pT7-4TPhiR und pT7-4TPhiL

Legende von Fig. 9:

A) Schematische Darstellung von T7-*Cla* C/*Hpa* B

Die 794 bp lange *Eco*RI/*Hind*III Insertion aus pT7-4CB enthält den T7 Terminator TPhi. Auf dem Fragment befinden sich außerdem 4 Schnittstellen für *Hin*PI (*H*) an Position 346, 348, 557 und 683 des Fragments (entsprechend 23892, 23894, 24103 und 24229 auf dem T7 Genom). Bei Hydrolyse dieses DNA-Fragments mit *Hin*PI entstehen die Fragmente A (346 bp), B (209 bp), C (126 bp) und D (111bp). Auf dem Subfragment *Hin*P C (557 bis 683 bzw. 24104 bis 24229 auf T7) befindet sich die Terminationsstelle von TPhi (24209 auf T7) und eine Schnittstelle für *Hae*II an Position 633 (24179 auf T7).

B) Klonierung von *Hin*P C in pT7-4

Das Plasmid pT7-4 wurde mit *Acc*I linearisiert und mit alkalischer Phosphatase behandelt. Da bei Hydrolyse mit *Hin*PI bzw. *Acc*I entstehende DNA-Fragmente kompatible Enden besitzen, konnte *Hin*P C in diesen Vektor eingebaut werden. Auf pT7-4TPhi kann die Insertion *Hin*P C in zwei Orientierungen (R und L) vorliegen. Bei pT7-4TPhiR ist die Orientierung des Terminators TPhi (Pfeilrichtung) bezüglich des Promotors Phi 10 wie auf dem T7 Genom, bei pT7-4TPhiL ist sie revers.

C) Bestimmung der Orientierung von *Hin*P C in pT7-4TPhi

Auf dem 2388 bp langen Plasmid pT7-4 befinden sich 9 Schnittstellen für *Hae*II an Position 93, 514, 525, 543, 977, 1435, 1515, 1782 und 2369 (S. Tabor, pers. Mitt.). Eine Hydrolyse von pT7-4 mit *Hae*II ergibt die Fragmente A (587 bp), B (458 bp), C (434 bp), D (421 bp), E (267 bp), F (112 bp), G (80 bp), H (18 bp) und I (11 bp).

Die Insertion *Hin*P C befindet sich in der Schnittstelle für *Acc*I an Position 28 von pT7-4. Eine Hydrolyse des rekombinanten Plasmids pT7-4TPhi in Orientierung R ergibt die bekannten Fragmente A, B, C, D, E, G, H und I sowie an Stelle von F zwei neue Fragmente J (141 bp) und K (97 bp). Bei Spaltung von pT7-4TPhi in Orientierung L entstehen hingegen zwei andere Fragmente L (123 bp) und M (115 bp).

Bei Orientierung R der Insertion wäre das kleinere Fragment 592 bp, bei Orientierung L wäre es 208 bp lang. Die Hydrolyse von pUC18CB mit *Kpn*I ergab ein Fragment von ca. 600 bp Länge (Fig. 7D 3), somit muß die Insertion in der Orientierung R vorliegen.

Die Insertion T7-*Cla* C/*Hpa* B aus pUC18CB wurde nach Restriktionsschnitt mit *Hind*III und *Eco*RI isoliert und in das ebenfalls mit *Hind*III und *Eco*RI geschnittene Plasmid pT7-4 eingebaut.

Das dabei gefundene rekombinante Plasmid pT7-4CB besitzt in seinem Polylinkerbereich eine 750 bp lange Insertion wie T7-*Cla* C/*Hpa* B (Fig. 7D 4). Da bei diesem Klonierungsschritt ein Fragment mit zwei unterschiedlichen Enden verwendet wurde, konnte der Einbau der Insertion in pT7-4CB nur so erfolgen, daß sich der Terminator TPhi in richtiger

Orientierung hinter dem T7 Promotor Phi 10 befindet. (Fig. 8D).

Die 792 bp lange *HindIII/EcoRI* Insertion aus pT7-4CB *Cla C/Hpa B* (Fig. 9A) wurde mit dem Restriktionsenzym *HinPI* gespalten. Dabei entstanden 4 Fragmente mit 346 (A), 209 (B), 126 (C) und 111 (D) bp Länge (Fig. 7C 2 und 9A). Eine Hydrolyse mit *HinPI* liefert DNA-Fragmente mit zu *AccI* kompatiblen Enden, welche in die *AccI*-Stelle des Polylinkers von pT7-4 kloniert werden können. Das 126 bp lange *HinPI/HinPI* Fragment C (Position 24103 bis 24229 auf dem T7 Genom) enthält die Terminationsstelle von TPhi bei Position 24209 von T7 (Dunn und Studier, 1983). Es wurde aus einem Polyacrylamid-Gel isoliert und in das mit *AccI* geschnittene Plasmid pT7-4 eingebaut (Fig. 9B).

Dabei entstanden die rekombinanten Plasmide pT7-4TPhiR und pT7-4TPhiL, die bei Restriktionsspaltung mit *HindIII* und *EcoRI* eine Insertion von ca. 180 bp Länge (126 bp aus *HinP C* und 51 bp aus dem Polylinker von pT7-4) besitzen (Fig. 7D 5,6).

Da bei diesem Klonierungsschritt ein DNA-Fragment mit gleichartigen Enden verwendet wurde, mußte wiederum die Orientierung der Insertion ermittelt werden. Das Fragment *HinP C* besitzt eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *HaeIII* bei Position 633 von T7-*ClaC/HpaB* (24179 auf T7) und wird in zwei Abschnitte unterteilt (Fig. 9A). Das Plasmid pT7-4 besitzt 9 Schnittstellen für *HaeIII* (Fig. 9C), bei Hydrolyse entstehen 9 DNA-Fragmente von 587 (A), 458 (B), 434 (C), 421 (D), 267(E), 112 (F), 80 (G), 18 (H) und 11 bp (I) Länge (Fig. 7D 7 und 9C). Die *AccI*-Stelle, in die das TPhi-Fragment einkloniert wurde, befindet sich bei Position 28 von pT7-4. Die benachbarten *HaeIII*-Stellen liegen bei den Positionen 2369 und 93 von pT7-4 (S. Tabor, Pers. Mitt.), sie begrenzen das DNA-Fragment F mit 112 bp Länge (Fig. 9C). Bei Spaltung eines pT7-4 Plasmids mit der 126 bp langen Insertion *HinP C* durch *HaeIII* fehlt somit das Fragment F. Dafür entstehen 2 neue *HaeIII*-Fragmente, die eine Länge von 141 (J) und 97 bp (K) bei Orientierung R und eine Länge von 123 (L) und 115 bp (M) bei Orientierung L von *HinP C* besitzen müssen (Fig. 9C).

Auf diese Weise konnten die rekombinanten Plasmide pT7-4TPhiR (richtige Orientierung des Terminators bezüglich des T7 Promotors) und pT7-4TPhiL (inverse Orientierung des Terminators bezüglich des T7 Promotors) identifiziert werden (Fig. 7D 8,9).

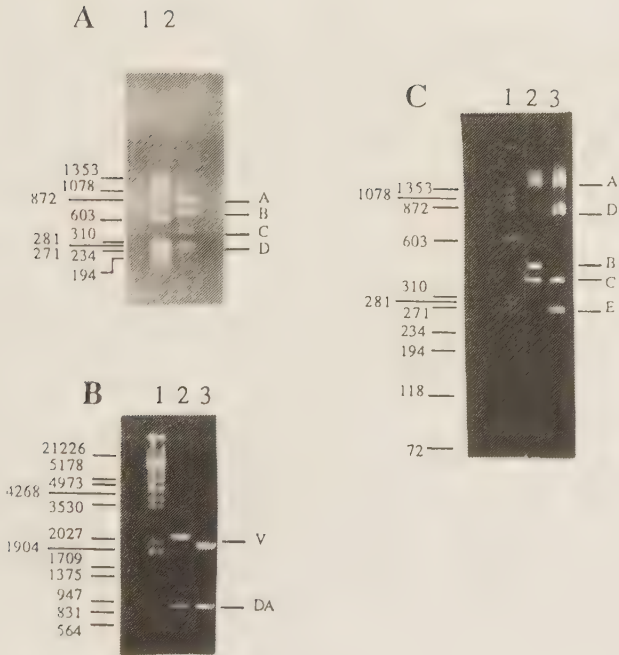


Fig. 10: Restriktionsspaltung des Fragments T7-*Cla* D und der Plasmide pUC18DA und pT7-4DA

A) Bei Hydrolyse des T7 Fragments *Cla* D mit *Hae*II (2) entstanden die Fragmente A (ca. 0,9 kb), B (ca. 0,7 kb), C (ca. 0,4 kb) und mehrere Fragmente D (jeweils ca. 0,3 kb). Als Längenstandard (1) wurde PhiX174/*Hae*III DNA verwendet.

B) Die Spaltung der Plasmide pUC18DA (2) und pT7-4DA (3) mit *Eco*RI und *Hind*III ergab neben den Banden der Vektoren (V) eine Insertion DA von ca. 900 bp Länge. Als Längenstandard (1) diente Lambda/*Eco*RI + *Hind*III DNA.

C) Bei Schnitt von pUC18 mit *Hae*II (2) entstanden 3 Fragmente A (ca. 1,9 kb), B (ca. 450 bp) und C (ca. 370 bp). Zur Bestimmung der Orientierung der Insertion DA wurde pUC18DA mit *Hae*II hydrolysiert (3). Dabei wurden neben A und C zwei neue Fragmente D (ca. 1000 bp) und E (ca. 290 bp) gefunden. Als Längenstandard (1) wurde PhiX174/*Hae*III DNA verwendet.

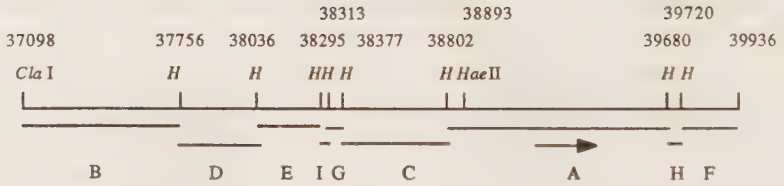
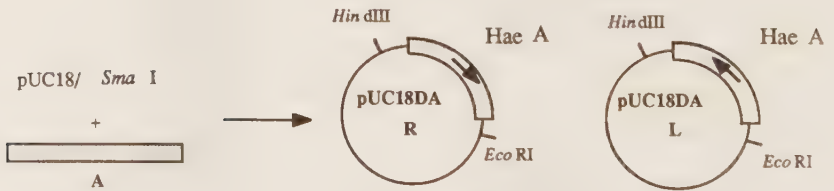
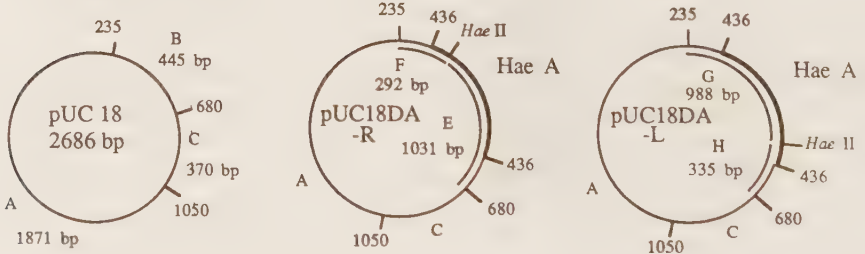
A T7-Cla D**B****C****D**

Fig. 11: Konstruktion der Plasmide pUC18DA und pT7-4DA

Legende von Fig. 11:

A) Schematische Darstellung von T7-Cla D

Das DNA-Fragment T7-Cla D reicht von Position 37094 bis zum Ende des T7-Genoms bei 39936. Auf Cla D befinden sich 8 Schnittstellen für HaeII (H) an Positionen 37756, 38036, 38295, 38312, 38377, 38802, 39680 und 39720. Bei Hydrolyse von Cla D mit HaeII entstehen die Fragmente A (878 bp), B (679 bp), C (425 bp), D (280 bp), E (259 bp), F (216 bp), G (64 bp), H (40 bp) und I (18 bp). Auf dem Subfragment Cla D/Hae A (38802 bis 39680) befindet eine Schnittstelle für HaeII an Position 38893.

B) Klonierung von Cla D/Hae A in pUC18

Das Plasmid pUC18 wurde mit Sma I linearisiert und mit alkalischer Phosphatase behandelt. In diesen Vektor wurde das Fragment Cla D/Hae A kloniert. Im rekombinanten Plasmid pUC18DA kann die Insertion in zwei Orientierungen (R und L) eingebaut werden. Die Richtung der Orientierung von Cla D/Hae A auf dem T7-Genom ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

C) Bestimmung der Orientierung von Cla D/Hae A in pUC18DA

Auf dem Plasmid pUC18 befinden sich 3 Spaltstellen für HaeII an den Positionen 235, 680 und 1050. Ein Restriktionsschnitt von pUC18 mit HaeII ergibt 3 Fragmente A (1871 bp), B (445 bp) und C (370 bp). Das Fragment Cla D/Hae A befindet sich in der Schnittstelle für SmaI an Position 436 von pUC18. Eine Hydrolyse des rekombinanten Plasmids pUC18DA in Orientierung R mit HaeII ergibt die Fragmente A und C, sowie zwei neue Fragmente E (1031 bp) und F (292 bp). Bei Spaltung von pUC18DA in Orientierung L entstehen hingegen neben A und C die Fragmente G (988 bp) und H (335 bp).

D) Klonierung von Cla D/Hae A in pT7-4

Die EcoRI/HindIII Insertion Cla D/Hae A aus pUC18DA-R wird in den Vektor pT7-4 eingebaut. Auf Grund der asymmetrischen Klonierung stimmt die Orientierung von Cla D/Hae A in pT7-4DA bezüglich des T7 Promotors, Phi 10 mit der Orientierung des Fragments auf dem T7-Genom (Pfeilrichtung) überein.

Bei Spaltung von T7-DNA mit ClaI entsteht auch ein Fragment T7-Cla D mit 2852 bp Länge (Fig. 7A.2). Es reicht von Position 37103 bis zum Ende des T7-Genoms bei 39961 (Fig. 11A). Auf diesem Abschnitt des T7-Genoms (ca. an Position 39400) sollte sich nach Golomb und Chamberlin (1974) ein Terminator für die Transkription durch T7-RNA-Polymerase befinden. Deshalb wurde T7-Cla D aus einem Gel isoliert und mit HaeII geschnitten. Dabei entstehen 8 Fragmente von 878(A), 679(B), 425(C), 280(D), 259(E), 216(F), 64(G), 40(H), und 18(I) bp Länge (Fig. 10A.2 und 11A). Das 878 bp lange Fragment T7-Cla D/Hae A mit dem vermuteten Terminator reicht von Position 38802 bis 39680 auf dem T7-

Genom und wurde in das mit *Sma*I geschnittene Plasmid pUC18 eingebaut (Fig. 11B). Das rekombinante Plasmid pUC18DA enthält eine Insertion von 900 bp Länge entsprechend *Cla* D/*Hae* A (Fig. 10B 2 und 11B).

Da eine Insertion mit gleichartigen (glatten) Enden eingebaut wurde, mußte nach dem Klonierungsschritt die Orientierung von *Cla* D/*Hae* A in pUC18DA bestimmt werden. Auf dem Fragment liegt eine Schnittstelle für *Hae*II bei Position 38893 des T7 Genoms (Fig. 11A) und unterteilt T7 *Cla* D/*Hae* A in zwei Abschnitte. Das Plasmid pUC18 besitzt drei Schnittstellen für *Hae*II an den Positionen 235, 680 und 1050 (Fig. 11C), so daß bei Restriktionsspaltung 3 Fragmente von 1871, 1031 und 370 bp Länge entstehen (Fig. 10C 2). Die Insertion *Cla* D/*Hae* A befindet sich in der *Sma*I-Schnittstelle von pUC18 bei Position 436. Somit entstehen bei Hydrolyse von pUC18DA mit *Hae*II 4 Fragmente mit 1871, 1031, 370 und 292 bp Länge bei Orientierung R und 4 Fragmente mit 1871, 988, 370 und 335 bp Länge bei Orientierung L (Fig. 11C). Die beiden kleinsten Fragmente von 292 bzw. 335 bp Länge können elektrophoretisch unterschieden werden. Die Restriktionsspaltung des rekombinanten Plasmids pUC18DA mit *Hae*II ergab ein Fragment von 290 bp Länge (Fig. 10C 3), somit liegt die Insertion *Cla* D/*Hae* A mit der Orientierung R vor.

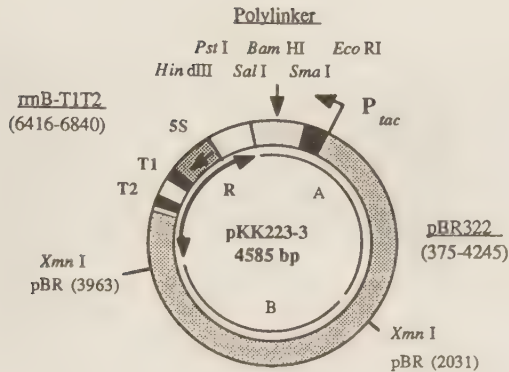
Nach Restriktionsspaltung von pUC18DA mit *Hind*III und *Eco*RI wurde das Fragment *Cla* D/*Hae* A isoliert und in pT7-4 kloniert (Fig. 11D). Das rekombinante Plasmid pT7-4DA enthält eine Insertion von 900 bp Länge im Polylinkerbereich (Fig. 10B 3). Die Orientierung von *Cla* D/*Hae* A in pT7-4DA bezüglich eines T7 des Promotors ist wie auf dem T7 Genom (Fig. 11D).

6.3. Vektoren mit DNA-Sequenzen aus dem *E. coli rrnB* Operon

Der 4585 bp lange Proteinexpressionsvektor pKK223-3 von Pharmacia (Fig. 12A) enthält neben einem Anteil aus pBR322 (375 bis 4245) den *E. coli tac* Promotor (De Boer *et al.*, 1983), einen Polylinker und den Bereich von Position 6416 bis 6840 aus dem *E. coli rrnB* Operon mit den Terminatoren *rrnB*-T1 und *rrnB*-T2 (Brosius *et al.*, 1981).

Das Plasmid pKK223-3 ist ähnlich einem Vektor von Amann *et al.* (1983), der zur Expression des Lambda Proteins cI in *E. coli* benützt wurde.

A



B

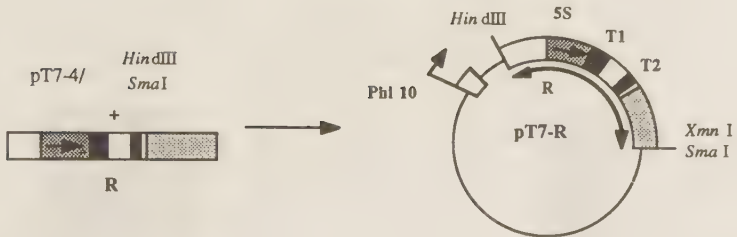


Fig. 12: Konstruktion des Plasmids pT7-R

A) Schematische Darstellung des Plasmids pKK223-3

Das Plasmid pKK223-3 von Pharmacia enthält den *E. coli* *tac* Promotor (P_{tac}), einen Polylinker mit Schnittstellen für *Eco*RI, *Sma*I, *Bam*HI, *Sal*I, *Pst*I und *Hind*III, einen Bereich aus dem Plasmid pBR322 von Position 375 bis 4245, sowie einen Abschnitt des *E. coli* *rrmB* Operons (*rrmB*T1T2) von Position 6416 bis 6840. Auf *rrmB*T1T2 liegen das Gen für die 5S rRNA und die beiden Terminatoren T1 und T2.

Eine Restriktionsstelle für *Hind*III befindet sich im Polylinker und zwei Schnittstellen für *Xmn*I befinden sich auf dem pBR322-Bereich von pKK223-3 (Positionen 2031 und 3963 auf pBR322). Bei Spaltung von pKK223-3 mit *Hind*III und *Xmn*I entstehen zwei Fragmente A und B mit jeweils 1,9 kb und ein Fragment R mit 0,7 kb.

B) Klonierung des Fragments R in pT7-4

Das Fragment R wurde in den mit *Hind*III und *Sma*I geschnittenen Vektor pT7-4 eingebaut. Die Orientierung von R in pT7-R bezüglich des T7 Promotors Phi 10 stimmt dabei mit der Orientierung von R bezüglich des *E. coli* *tac* Promotors auf pKK223-3 überein.

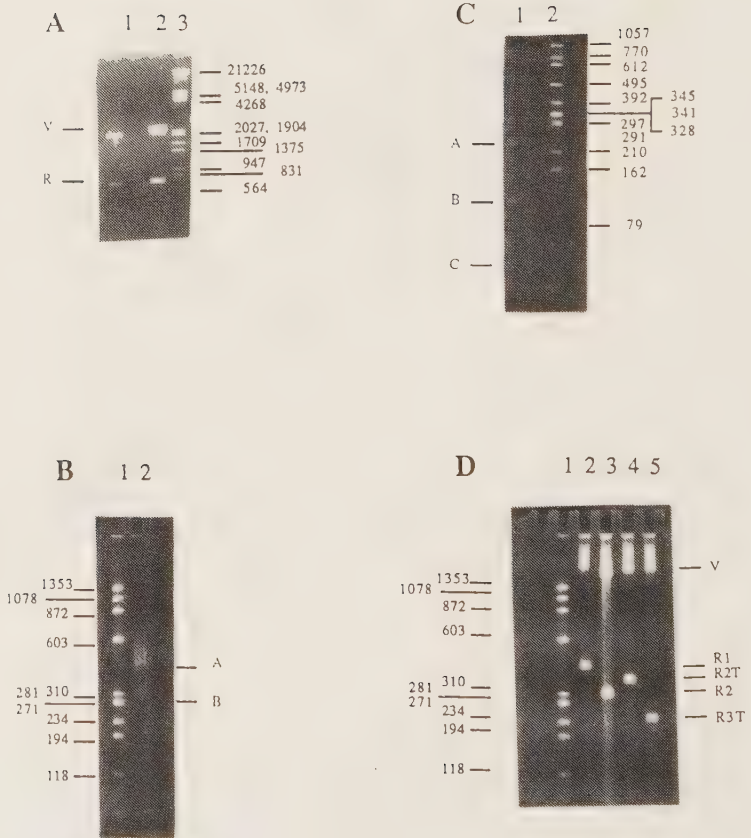


Fig. 13: Restriktionsspaltung der Plasmide pKK223-3, pT7-R, pT7-R1, pT7-R2, pT7-R2T und pT7-R3T

Legende von Fig. 13:

A) Bei Hydrolyse des Plasmids pKK223-3 mit *Hind*III und *Xmn*I (1) entstand eine Bande 700 bp Länge (R). Das DNA-Fragment R wurde neben dem Vektor (V) auch bei Schnitt des rekombinanten Plasmids pT7-R mit *Eco*RI und *Hind*III (2) gefunden.
Als Längenstandard (3) diente Lambda/*Eco*RI + *Hind*III DNA.

B) Eine Restriktionsspaltung von R mit *Hpa*II (2) ergab zwei Fragmente A (ca. 400 bp) und B (ca. 300 bp).
Als Längenstandard (1) wurde PhiX174/*Hae*III DNA verwendet.

C) Eine Restriktionsspaltung des Fragments R2T mit *Hin*PI (1) ergab drei Fragmente D (230 bp), E (100 bp) und F (50 bp).
Als Längenstandard (2) wurde PhiX174/*Hinc*II DNA verwendet.

D) Bei Hydrolyse der Plasmide pT7-R1 (2), pT7-R2 (3), pT7-R2T (4) und pT7-R3T (5) mit *Eco*RI und *Hind*III waren neben dem Vektor (V) die Insertionen R1 mit ca. 420 bp, R2 mit ca. 340 bp, R2T mit ca. 390 bp und R3T mit ca. 230 bp zu erkennen.
Als Längenstandard (1) wurde PhiX174/*Hae*III DNA verwendet.

Auf pKK223-3 liegen eine Schnittstelle für *Hind*III und zwei Schnittstellen für *Xmn*I (Fig. 12A). Bei Restriktionsspaltung mit beiden Enzymen entstehen zwei DNA-Fragmente mit jeweils 1,9 kb Länge und ein Fragment R mit 0,7 kb Länge (Fig. 12A und 13A 1). Der Bereich aus dem *rrnB* Operon liegt auf dem *Hind*III/*Xmn*I Fragment R (Fig. 14A), das isoliert und in den mit *Hind*III und *Sma*I geschnittenen Vektor pT7-4 kloniert wurde (Fig. 12B). Das rekombinante Plasmid pT7-R (Fig. 12B) enthält die Insertion R von 0,75 kb Länge in seinem Polylinkerbereich (Fig. 13A 2).

Zur Subklonierung wurde R als 734 bp langes *Eco*RI/*Hind*III Fragment aus pT7-R isoliert und mit *Hpa*II gespalten. Nach seiner Nukleotidsequenz (Brosius *et al.*, 1981) besitzt R zwei Schnittstellen für *Hpa*II an den Positionen 6706 und 6740 von *rrnB*. Bei Hydrolyse von R mit *Hpa*II entstehen somit 3 Fragmente mit 397 bp (A), 296 (B) und 34 bp (C) Länge (Fig. 13B 2 und 14A). Das *Hpa*II/*Eco*RI Fragment A enthält den Bereich von Position 6741 bis 6840 aus *rrnB* (Fig. 14A). Es wurde in das Plasmid pT7-4, das mit *Acc*I und *Eco*RI gespalten war, einkloniert. Das rekombinante Plasmid pT7-R1 (Fig. 14B) enthält eine Insertion mit 420 bp Länge im Polylinkerbereich (Fig. 13D 2), die mit der erwarteten Länge von R1 (397 bp von *Hpa* A und 20 bp vom Polylinker) übereinstimmt.

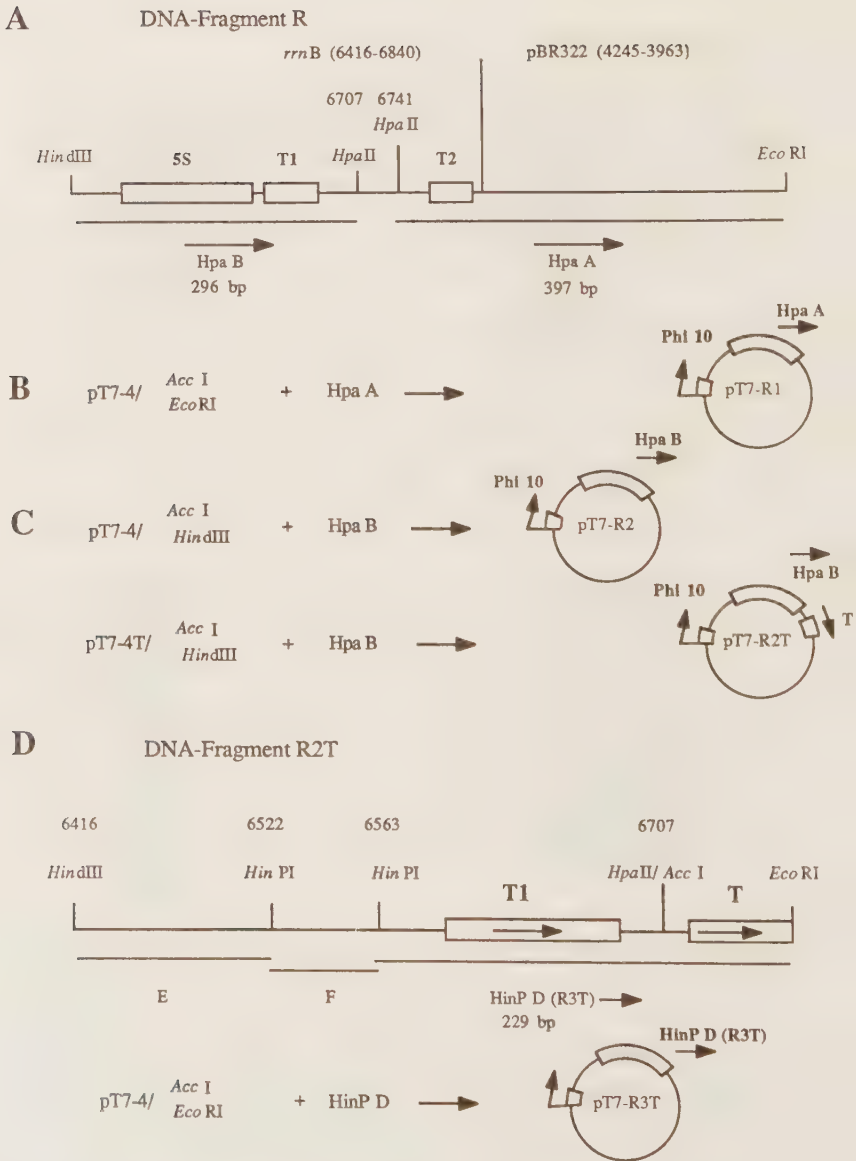


Fig. 14: Subklonierung des Fragments R in die Plasmide pT7-4 und pT7-4T

Legende von Fig. 14:

A) Schematische Darstellung des Fragments R

Die 727 bp lange *EcoRI/HindIII* Insertion R aus pT7-R enthält den Bereich von 6416 bis 6840 aus dem *E. coli rrmB* Operon mit dem 5S rRNA Gen und den beiden Terminatoren *rrmB*-T1 und *rrmB*-T2, sowie einen Bereich aus pBR322 (Position 4245 bis 3963).

Auf R befinden sich zwei Schnittstellen für *HpaII* an Position 296 und 330 des Fragments (Positionen 6707 und 6741 auf *rrmB*). Bei Hydrolyse von R mit *HpaII* entstehen 3 Fragmente A (397 bp), B (296 bp) und C (34 bp).

Auf dem Subfragment *Hpa* A befindet sich der Terminator *rrmB*-T2.

Auf *Hpa* B befinden sich das 5S rRNA Gen und der Terminator *rrmB*-T1. Außerdem liegen auf *Hpa* B zwei Schnittstellen für *HinPI* an Position 101 und 152 des Fragments (Positionen 6522 und 6573 auf *rrmB*).

B) Konstruktion von pT7-R1

Das 397 bp lange *HpaII/EcoRI* Fragment *Hpa* A wurde in den mit *AccI* und *EcoRI* geschnittenen Vektor pT7-4 kloniert. Die Insertion von pT7-R1 enthält den Bereich von Position 6741 bis 6840 aus *rrmB* mit dem Terminator *rrmB*-T2, sowie den Bereich 4245 bis 3963 aus pBR322.

C) Konstruktion von pT7-R2 und pT7-R2T

Das 296 bp lange *HindIII/HpaII* Fragment *Hpa* B wurde in die mit *AccI* und *HindIII* geschnittenen Vektoren pT7-4 und pT7-4T kloniert. Die Insertion von pT7-R2 und pT7-R2T enthält den Bereich von 6416 bis 6706 aus *rrmB* mit dem 5S rRNA Gen und dem Terminator *rrmB*-T1.

D) Konstruktion von pT7-R3T

Eine Spaltung der 381 bp langen *HindIII/EcoRI* Insertion mit *HinPI* ergibt 3 Fragmente D (229 bp), E (101 bp) und F (51 bp). Das Subfragment *HinP* D (R3T) enthält den Bereich 6654 bis 6706 aus *rrmB* mit dem Terminator *rrmB*-T1, sowie das synthetische DNA-Fragment T. *HinP* D wurde als *HinP* I/*EcoRI* Fragment in den mit *AccI* und *EcoRI* geschnittenen Vektor pT7-4 eingebaut.

Das 296 bp lange *HindIII/HpaII* Subfragment B aus R enthält den Bereich von Position 6416 bis 6706 auf dem *rrmB* Operon (Fig. 14A). Es wurde in die mit *HindIII* und *AccI* geschnittenen Plasmide pT7-4 und pT7-4T kloniert. Die rekombinanten Plasmide pT7-R2 und pT7-R2T (Fig. 14C) enthalten Insertionen von ca. 340 bzw. 380 bp Länge (Fig. 13D 2,3). Die Mobilität der Insertionen entspricht dabei der erwarteten Längen von R2 mit 332 bp (296 bp von B, 36 bp vom Polylinker) und R2T mit 380 bp (332 bp von R2 und 48 bp vom Terminator T).

Das 380 bp lange *EcoRI/HindIII* Fragment R2T (Fig. 14D) wurde mit dem Restriktionsenzym *HinPI* gespalten. *HinPI* besitzt zwei Schnittstellen im Fragment R2T an den Positionen 6511 und 6562 auf *rrmB*. Bei Hydrolyse

entstehen 3 Fragmente mit 229 (D), 101 (E) und 51 (F) bp Länge (Fig. 13C und 14D). Das *HinPI/EcoRI* Fragment D (Position 6563 bis 6706 auf *rrnB*) wurde in das mit *EcoRI* und *AccI* gespaltene Plasmid pT7-4 eingebaut. Das rekombinante Plasmid pT7-R3T (Fig. 14D) besitzt eine Insertion mit ca. 230 bp Länge im Polylinkerbereich (Fig. 13D), deren Mobilität der erwarteten Länge von R3T mit 229 bp entspricht (Fig. 14D).

6.4. Vektoren mit dem 3d^{rif} Gen

Das Plasmid pUC8-3d (Heinrich, 1987) enthält das 3d^{rif} Gen als 2145 bp langes *BamHI/BamHI* Fragment in seinem Polylinkerbereich (Fig. 15A). Durch Hydrolyse mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *PstI* wurde das 3d^{rif} Gen mit einem Teil des Polylinkers aus pUC8-3d herausgeschnitten und aus einem Agarose-Gel isoliert. Das *EcoRI/PstI* 3d^{rif} Fragment wurde in die Plasmide pT7-4 und pT7-6 kloniert, die ebenfalls mit *EcoRI* und *PstI* gespalten waren (Fig. 15B). Eine Selektion auf Anwesenheit des 3d^{rif} Gens erfolgte durch Inkubation der Klone auf einer LB-Platte in Gegenwart von 30 µg/mL Rifampicin. Auf diese Weise konnten die rekombinanten Plasmide pRif-4 und pRif-6 (Fig. 15B) gefunden werden. Da die Orientierung des 3d^{rif} Gens in pUC8-3d^{rif} bekannt war (vgl. Fig. 15A) und die Rif-Insertion asymmetrisch in die T7 Vektoren kloniert wurde, mußte ihre Orientierung in den Plasmiden pRif-4 und pRif-6 nicht bestimmt werden.

pRif-4 und pRif-6 besitzen bei Restriktionsspaltung mit *EcoRI* und *PstI* eine 2,2 kb lange Insertion in ihrem Polylinkerbereich, die bei pRif-6 allerdings nicht erkennbar ist, da sie auf gleicher Höhe mit der 2,2 kb langen Bande der Vektor-DNA wandert (Fig. 16A 2,3).

Die Anwesenheit der 3d^{rif}-Insertion in pRif-6 konnte aber durch eine Restriktionsspaltung mit *HindIII* gezeigt werden. Auf dem 3d^{rif} Gen befinden sich zwei Restriktionsstellen für *HindIII* an den Positionen 36 und 884 (Fig. 15A). Bei einer Länge des 3d^{rif}-Gens von 2145 bp sind daher bei Spaltung von pRif-4 und pRif-6 mit *EcoRI* und *HindIII*

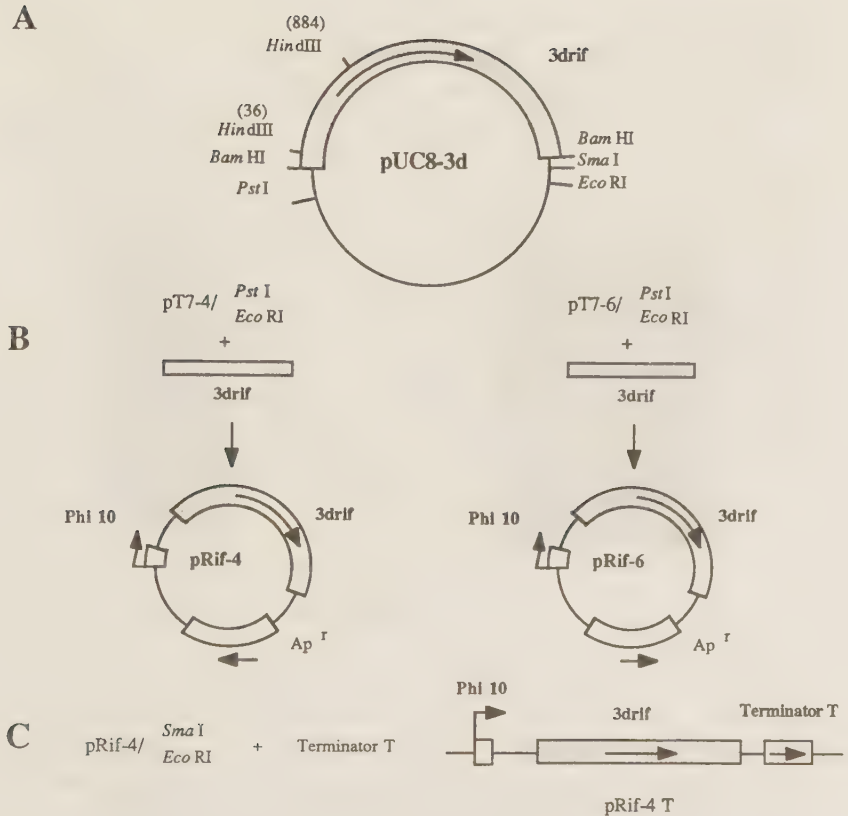


Fig. 15: Konstruktion von pRif-4, pRif-6 und pRif-4T

A) Schematische Darstellung von pUC8-3d

Das Plasmid pUC8-3d enthält als Insertion das 2,1 kb lange $3d^{rif}$ Gen in der *Bam*HI-Schnittstelle seines Polylinkers. Die Orientierung der $3d^{rif}$ Insertion nach der Nomenklatur bei Heinrich (1987) ist gekennzeichnet (Pfeil). Auf $3d^{rif}$ befinden sich auch zwei Schnittstellen für *Hind*III an Position 36 und 884.

B) Konstruktion von pRif-4 und pRif-6

Die $3d^{rif}$ -Insertion aus pUC8-3d wurde als 2,2 kb langes *Eco*RI/*Pst*I Fragment in pT7-4 und pT7-6 eingebaut. Dabei entstanden die Plasmide pRif-4 und pRif-6, auf denen sich $3d^{rif}$ hinter dem T7 Promotor Phi 10 befindet.

C) Konstruktion von pRif-4T

In mit *Eco*RI und *Sma*I gespaltenes pRif-4 wurde das DNA-Fragment T aus pT7-4T (ebenfalls mit *Eco*RI und *Sma*I Enden) eingebaut. Das rekombinante Plasmid pRif-4T enthält das Fragment T und die $3d^{rif}$ Insertion. Auf Grund seiner Mobilität bei der Gelelektrophorese liegt pRif-4T in einer multimeren Form vor (vgl. Fig. 16 A, Spur 10).



Fig. 16: Restriktionsspaltung der Plasmide pRif-4, pRif-6 und pRif-4T

A) Bei Hydrolyse der Plasmide pRif-4 (2), pRif-6 (3) und pRif-4T (4) mit *EcoRI* und *PstI* war neben dem Vektor (V) nur bei (2) eine Insertion Rif mit 2,2 kb (schneller als V) im Polylinker zu erkennen. Bei (3) und (4) wandern hingegen die Banden V und Rif auf gleicher Höhe. Eine Spaltung von pRif-4 (5), pRif-6 (6) und pRif-4T (7) mit *EcoRI* und *HindIII* ergab auf allen 3 Spuren neben dem Vektor (V) zwei Fragmente A (1,3 kb) und B (0,8 kb), die charakteristisch für die Anwesenheit der $3d^{rif}$ Insertion sind (siehe Text).

Ohne Restriktionsschnitt wandert das Plasmid pRif-4T (10) erheblich langsamer als pRif-4 (8) und pRif-6 (9).

Als Längenstandard (1) wurde Lambda/*HindIII* DNA verwendet.

B) Bei Spaltung von pT7-4T mit *EcoRI* und *SacI* (1) war die Insertion T mit 58 bp Länge zu sehen. Ein Fragment mit Länge von T wurde auch bei Spaltung von pRif-4T (3) mit den gleichen Enzymen gefunden. Es fehlte hingegen bei pRif-4 (4) und pRif-6 (5). Auf allen Spuren waren die Banden der Vektoren (V) zu erkennen.

Als Längenstandard (2) wurde PhiX174/*HaeIII* DNA verwendet.

neben der Bande des Vektors DNA-Fragmente mit 1261 und 848 bp Länge zu erwarten. DNA-Fragmente A und B mit der charakteristischen Länge von 1,3 und 0,8 kb Länge wurden bei Hydrolyse von pRif-4 und pRif-6 mit *HindIII* und *EcoRI* tatsächlich gefunden (Fig. 16A 5,6).

Zur Insertion in pRif-4 wurde das DNA-Fragment T nach Hydrolyse von pT7-4 mit *EcoRI* und *SmaI* isoliert und in das ebenfalls mit *EcoRI* und *SmaI* geschnittene Plasmid pRif-4 kloniert (Fig. 15C). Das rekombinante Plasmid pRif-4T (Fig. 15C) enthält im Gegensatz zu pRif-4 und pRif-6 ein Fragment mit der Größe von T zwischen den Schnittstellen für *EcoRI* und *SacI* (Fig. 16B). Bei Spaltung von pRif-4T mit *EcoRI* und *HindIII* treten auch die bereits bei pRif-4 und pRif-6 gefundenen DNA-Fragmente von 0,8 und 1,3 kb Länge auf (Fig. 16A 7).

In einem Agarose-Gel wandert pRif-4T ohne Restriktionsschnitt (Fig. 16A 10) allerdings deutlich langsamer als pRif-4 (Fig. 16A 8), es muß sich also bei pRif-4T um ein Plasmid in konkatemerer Form handeln.

6.5. Vektoren mit dem Tet-Gen aus pBR322

Durch Restriktionsspaltung des Plasmids pBR322 (Bolivar *et al.*, 1977) mit den Enzymen *AvaI* und *HindIII* entsteht ein DNA-Fragment Tet mit 1,4 kb Länge (Fig. 17A). Auf Tet befindet sich das Tetracyclin-Resistenz Gen ohne einen funktionsfähigen Promotor, aber mit intakter ribosomaler Bindungsstelle (West und Rodriguez, 1982). Das Tet-Fragment wurde in das ebenfalls mit *HindIII* und *AvaI* geschnittene Plasmid pT7-4 kloniert (Fig. 17B). Das entstandene rekombinante Plasmid pTet-4 (Fig. 17B) besitzt bei Hydrolyse mit *EcoRI* und *HindIII* eine 1,4 kb lange Insertion (Fig. 18A 2).

Das Tet-Fragment wurde durch Hydrolyse mit *HindIII* und *EcoRI* aus pTet-4 herausgeschnitten, isoliert und in das mit *EcoRI* und *HindIII* geschnittene Plasmid pT7-6 kloniert (Fig. 17C). Das rekombinante Plasmid pTet-6 (Fig. 17C) besitzt ebenfalls die Tet-Insertion (Fig. 18A 3).

In die mit *EcoRI* und *SacI* geschnittenen Plasmide pTet-4 und pTet-6 wurde das mit *EcoRI* und *SacI* Enden vorliegende DNA-Fragment T kloniert (Fig. 17D). Die entstandenen rekombinanten Plasmide pTet-4T und pTet-6T (Fig. 17D) besitzen sowohl die Tet-Insertion (Fig. 18A 4,5), wie auch ein DNA-Fragment mit der Länge von T (Fig. 18B 4,6).

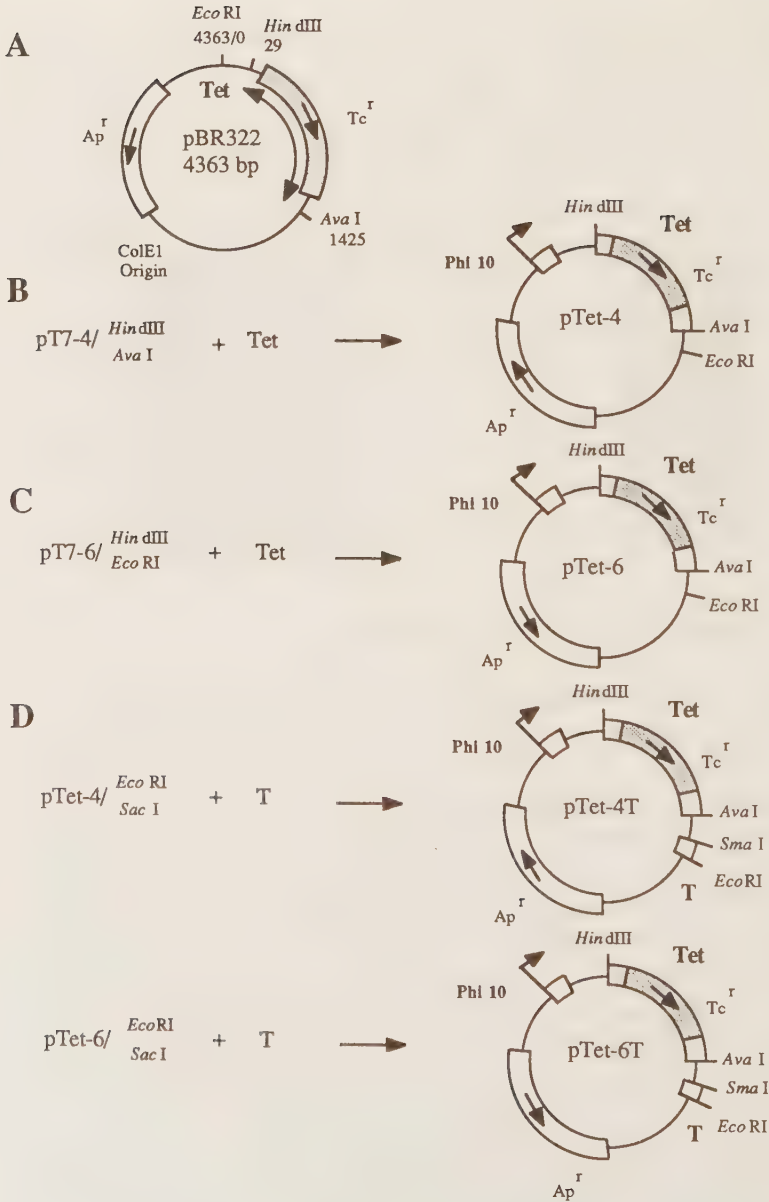


Fig. 17: Konstruktion der Plasmide pTet-4, pTet-6, pTet-4T und pTet-6T

Legende von Fig. 17:

A) Schematische Darstellung von pBR322

Auf dem 4363 bp langen Plasmid pBR322 (Bolivar *et al.*, 1977) liegen Gene für die Resistenz gegen Ampicillin (Amp^r) und Tetracyclin (Tet^r), sowie der Col E1 "Origin of Replication". An Position 29 befindet sich eine Schnittstelle für *Hind*III und an Position 1425 eine Schnittstelle für *Ava*I. Bei Hydrolyse von pBR322 mit *Hind*III und *Ava*I entsteht das 1,4 kb lange Fragment Tet, auf dem sich das Gen für die Tetracyclin-Resistenz (ohne einen funktionsfähigen Promotor) befindet.

B) Konstruktion von pTet-4

Das Fragment Tet wurde in den mit *Hind*III und *Ava*I geschnittenen Vektor pT7-4 eingebaut. Dabei entstand das rekombinante Plasmid pTet-4, auf dem sich das Tet-Gen hinter dem T7 Promotor Phi 10 befindet.

C) Konstruktion von pTet-6

Die Tet-Insertion aus pTet-4 wurde als 1,45 kb langes *Eco*RI/*Hind*III Fragment isoliert und in den mit *Eco*RI und *Hind*III geschnittenen Vektor pT7-6 kloniert. Dabei entstand ein rekombinantes Plasmid, das pTet-6 bezeichnet wurde.

D) Konstruktion von pTet-4T und pTet-6T

In die mit *Eco*RI und *Sac*I geschnittenen Plasmide pTet-4 und pTet-6 wurde das DNA-Fragment T eingebaut. Dabei entstanden die Plasmide pTet-4T und pTet-6T, auf denen sich das Fragment T hinter dem Tet-Gen befindet.

6.6. Vektoren mit dem Cat-Gen aus pSV0-Cat

Aus dem Plasmid pSV0-Cat (Gorman *et al.*, 1982 und Fig. 19A) wurde durch Restriktionsspaltung mit *Bam*HI und *Hind*III die 1,7 kb lange Insertion Cat isoliert (Fig. 20A 10). Auf Cat befindet sich ein 773 bp langes Fragment mit dem Gen für die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase aus pBR322-Tn9 ohne eigenen funktionsfähigen Promotor (Gorman *et al.*, 1982) und ein 988 bp langes DNA-Fragment mit der Polyadenylierungsstelle von SV40 aus pSV2-BG (Mulligan und Berg, 1981).

Das Cat-Fragment wurde in die mit *Bam*HI und *Hind*III geschnittenen Plasmide pT7-4, pT7-6, pT7-4T und pT7-6T kloniert (Fig. 19B). Dabei entstanden die rekombinanten Plasmide pCat-4, pCat-6, pCat-4T und pCat-6T (Fig. 19B), in denen sich eine Insertion von 1,7 kb - der Länge von Cat - befindet (Fig. 20A, 2 bis 5). In den Plasmiden pCat-4T und pCat-6T wird bei Hydrolyse mit *Eco*RI und *Sac*I auch das DNA-Fragment T beobachtet (Fig. 20B 3,5).

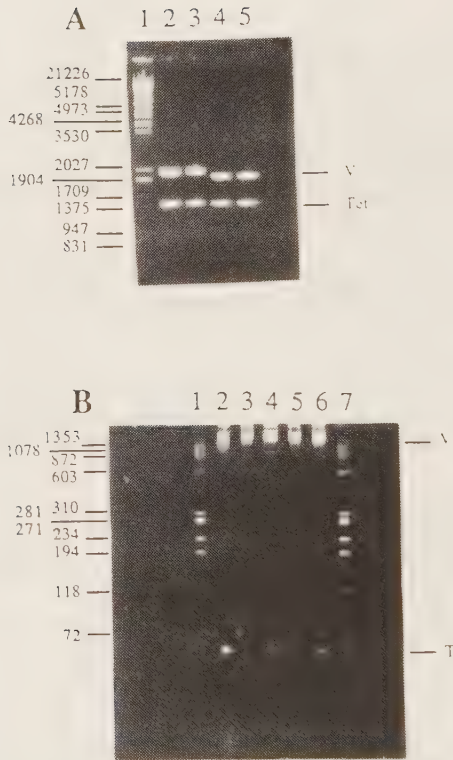


Fig. 18: Restriktionsspaltung der Plasmide pTet-4, pTet-4T, pTet-6 und pTet-6T

A) Bei Hydrolyse der Plasmide pTet-4 (3), pTet-4T (4), pTet-6 (5) und pTet-6T (6) mit *EcoRI* und *HindIII* war neben den Banden der Vektoren pT7-4 und pT7-6 (V) eine Insertion Tet mit 1,4 kb zu erkennen. Als Längenstandard (1) diente Lambda/*EcoRI* + *HindIII* DNA.

B) Bei Spaltung von pT7-4T mit *EcoRI* und *SacI* (2) war die Insertion T mit 58 bp Länge zu sehen. Ein Fragment der gleichen Länge wurde ebenfalls bei Schnitt von pTet-4T (4) und pTet-6T (6) mit *EcoRI* und *SacI* beobachtet. Es fehlte hingegen bei pTet-4 (3) und pTet-6 (5). Auf allen Spuren waren die Banden der Vektoren (V) zu erkennen. Als Längenstandard (1) wurde PhiX174/*HaeIII* DNA verwendet.

Auf gleiche Art wurden aus den mit *Bam*HI und *Hind*III geschnittenen Plasmiden pT7-4S1 und pT7-4S2 die Plasmide pCat-4S1 und pCat-4S2 konstruiert (Fig. 19B), welche die Cat-Insertion (Fig. 20A 6,7), sowie die Fragmente S1 und S2 aufweisen (Fig. 20B, 6,7).

Die Plasmide pT7-4TPhiR (Meth., 6.2.) und pT7-R3T (Meth., 6.4.) wurden mit *Hind*III linearisiert und die 5'-überhängenden Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt. Bei anschließender Hydrolyse mit *Sac*I wurden die Insertionen *Hin*P C aus pT7-4TPhi und R3 aus pT7-R3T herausgeschnitten (Fig. 21A). Diese DNA-Fragmente mit jeweils einem *Sac*I und einem glatten Ende wurden isoliert und in das mit *Sma*I und *Sac*I geschnittene Plasmid pCat-6 kloniert (Fig. 21B). Das rekombinante Plasmid pCat 6Phi (Fig. 21B) besitzt bei einer Spaltung mit *Pst*I und *Sac*I eine Insertion mit 160 bp Länge, die der erwarteten Länge von *Hin*P C mit 156 bp (126 bp aus T7 DNA, 30 bp aus dem Polylinker) entspricht (Fig. 20B 8). Auf dem rekombinanten Plasmid pCat-6R (Fig. 21B) findet sich bei Hydrolyse mit *Pst*I und *Sac*I eine Insertion mit ca. 180 bp Länge, die der erwarteten Länge von R3 mit 174 bp (144 bp aus dem *rnn*B Operon, 30 bp aus dem Polylinker) entspricht (Fig. 20B 9).

6.7. Transformation von *E. coli* K38/pGP1-2 Bakterien mit T7 Vektoren

Eine Transformation von *E. coli* K38/pGP1-2 Zellen erfolgte stets mit bereits charakterisierten T7 Promotor Plasmiden. Die Selektion auf transformierte Klone mit pGP1-2 (Fig. 22) und einem T7 Vektor wurde in Gegenwart der Antibiotika Ampicillin und Kanamycin durchgeführt. Aus den positiv transformierten Bakterienkolonien wurde mittels der Schnellaufschluß-Methode Plasmid-DNA isoliert (vgl. Meth., 2.2). Bei jeder Transformation erfolgte eine Überprüfung des T7 Promotor-Plasmids auf Anwesenheit der korrekten DNA-Insertionen. Dies geschah durch Restriktionsschnitte mit geeigneten Enzymen (vgl. Meth., 4.1.).

Auf diese Weise wurden Doppelplasmidstämme mit pGP1-2 bzw. pT7-4, pT7-4T, pT7-6 (Meth., 6.1.), pRif-4, pRif-6, pRif-4T (Meth., 6.4.), pTet-4, pTet-6, pTet-4T, pTet-6T (Meth., 6.5), pCat-4, pCat-6, pCat-4T, pCat-6T, pCat-4S1, pCat-4S2, pCat-6Phi, pCat-6R (Meth., 6.6.) und pBR322 konstruiert.

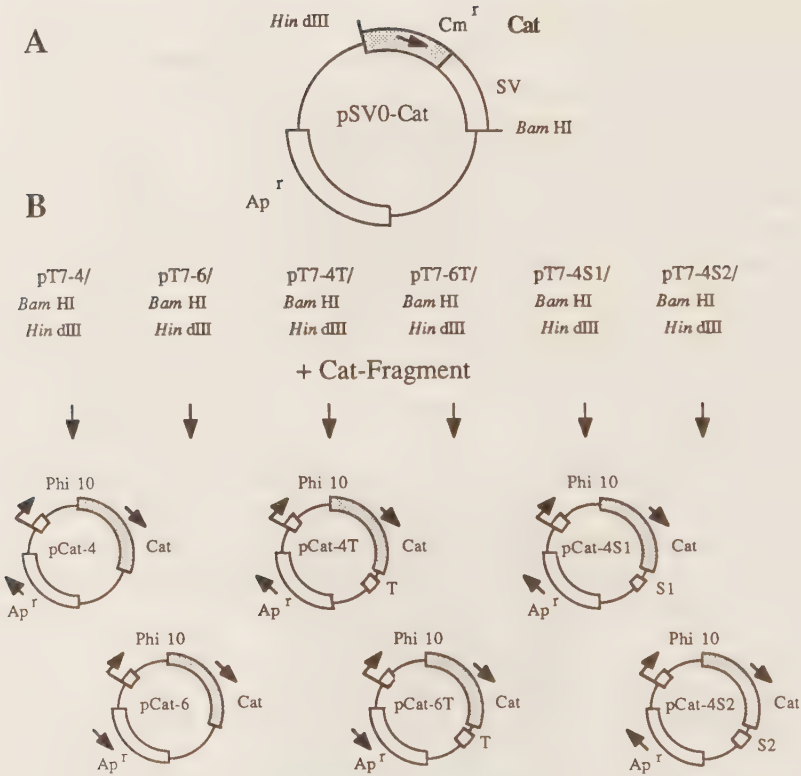


Fig. 19: Konstruktion der Plasmide pCat-4, pCat-6, pCat-4T, pCat-6T, pCat-4S1 und pCat-4S2

A) Schematische Darstellung von pSV0-Cat

Auf dem Plasmid pSV0-Cat befindet sich die 1,7 kb lange *Hind*III/*Bam*HI Insertion Cat. Cat besteht aus einem 773 bp langen DNA-Fragment mit dem Chloramphenicol-Resistenzgen (Cm^r) und einem 988 bp langen DNA-Fragment aus dem Virus SV 40 (SV), auf dem sich die Polyadenylierungsstellen der frühen Transkription befinden.

B) Konstruktion von T7 Vektoren mit der Cat-Insertion

Die Vektoren pT7-4, pT7-6, pT7-4T, pT7-6T, pT7-4S1 bzw. pT7-4S2 wurden mit *Bam*HI und *Hind*III hydrolysiert. Durch Einbau der Cat-Insertion entstanden die rekombinanten Plasmide pCat-4, pCat-6, pCat-4T, pCat-6T, pCat-4S1 und pCat-4S2.

Auf pCat-4T und pCat-6T befindet sich das Fragment T, auf pCat-4S1 das Fragment S1 und auf pCat-4S2 das Fragment S2 hinter dem Cat-Gen.

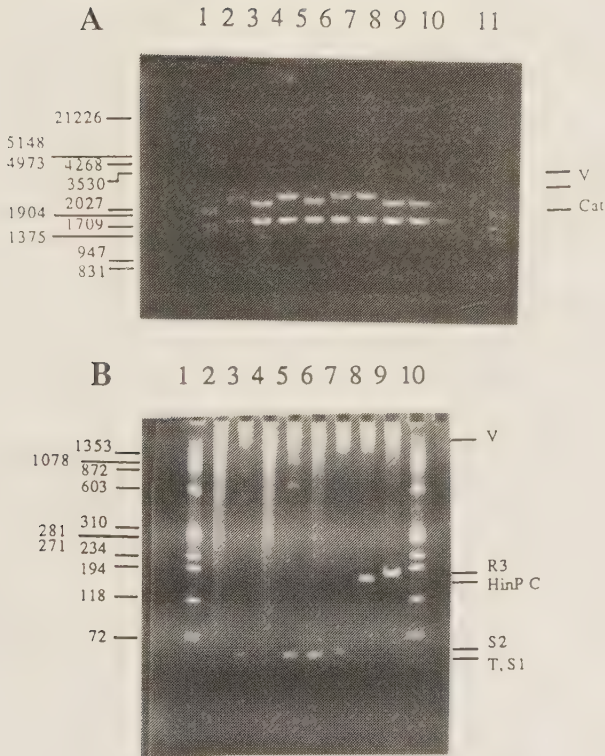


Fig. 20: Hydrolyse der Plasmide mit Cat-Insertion

A) Bei Spaltung von pSV0-Cat mit *Bam*HI und *Hind*III (10) entstanden 2 Fragmente von ca. 3 kb und 1,7 kb (Cat). Ein Schnitt der Plasmide pCat-4 (2), pCat-6 (3), pCat-4T (4), pCat-6T (5), pCat-4S1 (6), pCat-4S2 (7), pCat-6Phi (8) und pCat-6R (9) mit denselben Enzymen ergab neben Banden der Vektoren (V) eine Insertion mit gleicher Länge wie Cat. Als Längenstandard (1 und 11) diente Lambda/*Eco*RI + *Hind*III DNA.

B) Bei Hydrolyse von pCat-4 (2) und pCat-6 (4) mit *Eco*RI und *Sac*I war keine Insertion zu erkennen. Dagegen waren nach Schnitt mit denselben Enzymen bei pCat-4T (3), pCat-6T (5), pCat-4S1 (6) und pCat-4S2 (7) die Insertionen T, S1 bzw. S2 zu sehen. Die Spaltung von pCat-6Phi (8) und pCat-6R (9) mit *Pst*II und *Sac*I ergab die Fragmente *Hin*P C mit ca. 160 bp bzw. R3 mit ca. 180 bp. Auf allen Spuren waren auch Banden der Vektoren (V) zu sehen.

Als Längenstandard (1 und 10) diente PhiX174/*Hae*III DNA.

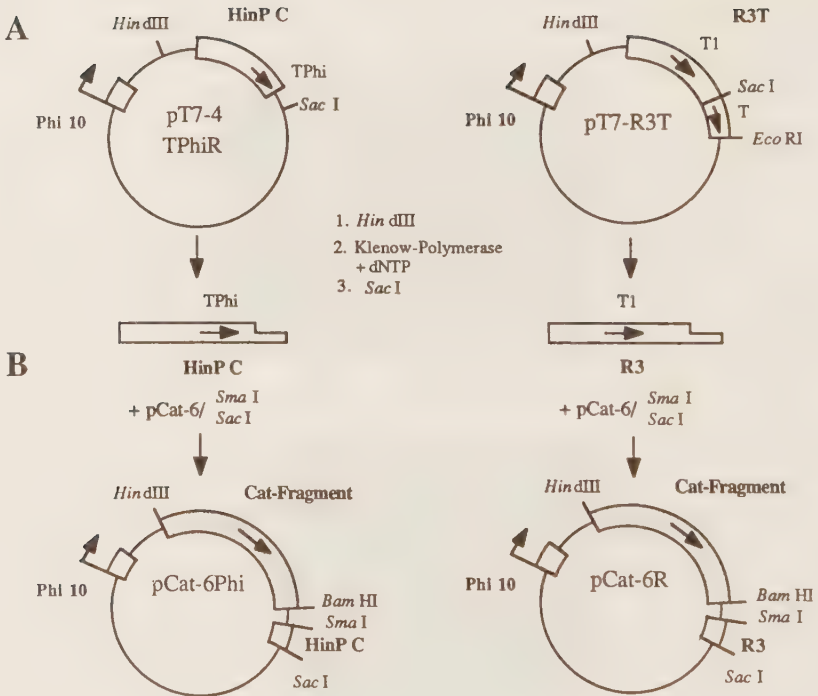


Fig. 21: Konstruktion der Plasmide pCat6Phi und pCat-6R

A) Isolierung der Fragmente *HinP C* und R3

Die Plasmide pT7-4PhiR und pT7-R3T wurden durch Hydrolyse mit *Hind*III linearisiert und die 5'-überhängenden Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt. Durch nachfolgende Spaltung mit *Sac*I entstanden die Fragmente *HinP C* bzw. R3 (mit jeweils einem glatten und einem *Sac*I Ende). Auf *HinP C* befindet sich der natürliche T7 Terminator TPhi und auf R3 der *E. coli* Terminator *rmb*-T1.

B) Klonierung von *HinP C* und R3

Das Plasmid pCat-6 wurde mit *Sac*I und *Sma*I geschnitten. In diesen Vektor wurden die Fragmente *HinP C* und R3 eingebaut. So wurden die rekombinanten Plasmide pCat-6Phi und pCat-6R erhalten, auf denen sich *HinP C* bzw. R3 bezüglich des T7 Promotors Phi 10 hinter dem Cat-Gen befinden.

7. ISOLIERUNG VON RNA

7.1. Isolierung von RNA in einem Rohextrakt aus *E. coli*

(nach Studier und Moffat, 1986; modifiziert)

Um zelluläre RNA aus *E. coli* für Northern-Hybridisierungs-Experimente zu gewinnen, wurden die Bakterienzellen durch Erhitzen in Gegenwart von SDS lysiert. Die im bakteriellen Rohextrakt vorliegende RNA wurde anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Dazu wurden 0,5 mL Bakterien 5 min lang abzentrifugiert und der Rückstand sofort bei -70°C eingefroren. Nach Auftauen auf Eis wurden die Zellen in 25 μL Protein-Lysis-Puffer (Meth., 5.5.) durch 3minütiges Erhitzen auf 95°C lysiert. Nach Zugabe von 25 μL Formamid-Farbstoff-Puffer, Denaturierung der RNA durch 10minütiges Erhitzen auf 70°C und Abschrecken auf Eis erfolgte Elektrophorese in einem Agarose-Harnstoff-Gel (Meth., 5.3.).

7.2. Anreicherung von zellulärer RNA aus *E. coli*

(nach Ausubel *et al.*, 1987; modifiziert)

Bei einem Experiment zur Northern-Hybridisierung (vgl. Fig. 44) wurde RNA nicht aus einem *E. coli* Rohextrakt, sondern nach Reinigung und Anreicherung verwendet.

Alle bei diesem Verfahren verwendeten Puffer waren aus frisch autoklavierten Lösungen zubereitet, die mit Diethylpyrocarbonat (50 μL auf 1 L) behandelt worden waren.

Es wurden 15 mL einer Bakterienkultur in LB-Medium mit $A_{600} \approx 0,5$ abzentrifugiert. Der Rückstand wurde in 0,5 mL frisch zubereitetem Lysis-Puffer (30 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% SDS, 100 $\mu\text{g/mL}$ Proteinase K) aufgenommen und mit Trockeneis/Methanol eingefroren. Nach Auftauen auf Eis wurde die Suspension durch Ultraschallbehandlung lysiert und zur Proteolyse 60 min lang bei 37°C inkubiert. Dann erfolgte Extraktion mit Phenol/Chloroform zur Abtrennung von Proteinen und Fällung mit Ethanol.

Nach Zentrifugation wurde der getrocknete Rückstand in 100 μL DNase-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl_2) aufgenommen, mit 1,5 μL DNase I (35 Einheiten) versetzt und 30 min lang bei 37°C inkubiert. Nach erneuter Phenolisierung und Fällung mit Ethanol wurde die RNA abzentrifugiert, getrocknet, in H_2O aufgenommen und sofort in Aliquots bei -70°C eingefroren.

Die angereicherte RNA wurde durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarose-Harnstoff-Gel untersucht (Meth. 5.3.). Das Kriterium für ausreichende Qualität war das Vorhandensein scharfer Banden der 16S und 23S rRNA-Spezies.

8. REAKTIONEN MIT RNA

8.1. *In vitro* Transkription mit T7 RNA-Polymerase

(nach Schenborn und Mierendorf, 1985; modifiziert)

Ein Standard-Reaktionsansatz für die *in vitro* Transkription mit T7 RNA-Polymerase enthielt - sofern nicht anders angegeben - in 12 μL Volumen 40 mM Tris-HCl pH 8.0, 6 mM MgCl_2 , 10 mM NaCl, 1 mM DTT, 4 mM Spermidin, 0,5 mM ATP, GTP, CTP und UTP, 8 Einheiten RNasin, 1 μL T7 RNA-Polymerase (0,2 mg/mL; 1:10 verdünnt), 1 μg DNA-Matrize und 1 μCi [α - ^{32}P] UTP (400 oder 3000 Ci/mmol). Die Inkubationsdauer betrug - sofern nicht anders angegeben - 10 min bei 37°C.

Danach wurde das Reaktionsgemisch bei -70°C eingefroren oder sofort nach Zugabe von 36 μL Formamid-Farbstoff-Puffer und Denaturierung durch Erhitzen elektrophoretisch in einem Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetrennt (vgl. Meth., 5.4.).

Um Abbau durch RNasen zu vermeiden, mußte bei der Herstellung von Lösungen der Reaktionskomponenten besonders sorgfältig gearbeitet werden. Der 2fach konzentrierte Reaktionspuffer wurde aus frisch zubereiteten Lösungen hergestellt und in Aliquots von 100 μL bei -20°C aufbewahrt. DTT wurde als 100 mM Lösung in 10 μL Aliquots bei -70°C gelagert. Als Matrize wurde nur DNA verwendet, die über eine CsCl -Gradientenzentrifugation gereinigt worden war.

8.2. RNA-Sequenzierung

(nach Axelrod und Kramer, 1985; modifiziert)

Die Sequenzierung von Transkripten geschah durch ein Kettenabbruchverfahren entsprechend der DNA-Sequenzierung nach Sanger *et al.* (1977). Die T7 RNA-Polymerase akzeptiert 3'-desoxy-NTPs als Substratanaloga, deren Einbau in ein Transkript den Kettenabbruch bewirkt.

Eine Reaktion zur RNA-Sequenzierung geschah in 5 parallel durchgeführten Ansätzen. Das Reaktionsvolumen betrug jeweils 4 μL . Der Ansatz N (ohne 3'-dNTP) enthielt 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 6 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 2 mM Spermidin, 50 μM ATP, GTP, CTP und UTP, 4 Einheiten RNasin, 0,2 μL T7 RNA-Polymerase (0,2 mg/mL, 1:10 verdünnt), 0,25 μg DNA-Matrize und 10 μCi [α - ^{32}P] UTP. In den Ansätzen A, G, C und U waren zusätzlich jeweils 12,5 μM 3'-dATP, 6,1 μM 3'-dGTP, 12,5 μM 3'-dCTP bzw. 12,5 μM 3'-dUTP anwesend. Die Inkubationsdauer betrug 30 min bei 37°C.

Nach Zugabe von Formamid-Farbstoff-Puffer und Denaturierung wurden die Proben dann sofort auf ein Gel aufgetragen (vgl. Meth. 5.4.).

Für die verwendeten Lösungen galt für die Herstellung und Aufbewahrung das gleiche wie bei Meth., 8.1..

8.3. Northern-Hybridisierung von zellulärer RNA

(nach Maniatis *et al.*, 1982; modifiziert)

Nach Auftrennung zellulärer RNA aus *E. coli* mittels Elektrophorese in einem Agarose-Harnstoff-Gel (vgl. Meth., 5.3.) wurde das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt und unter einer UV-Lampe photographiert. Die Nukleinsäuren wurden dann mittels Kapillarblotting in 10x SSC-Puffer (1,5 M NaCl, 150 mM Na-Citrat) auf eine Nylonmembran transferiert.

Nach Beendigung des Transfers wurde die Nylon-Membran getrocknet und 2 h lang zur Fixierung der Nukleinsäuren bei 80°C gebacken. Zur Vorhybridisierung wurde die Membran mit 20 mL einer Lösung von 5x SSPE pH 6.5 (50 mM NaH_2PO_4 , 750 mM NaCl, 5 mM EDTA), 0,66% Magermilchpulver und 50% Formamid 24 h lang bei 42°C inkubiert.

Nach Zugabe der Nick-translatierten radioaktiven Probe (vgl. Meth., 3.5.) erfolgte die Hybridisierung durch weitere 24stündige Inkubation bei 42°C.

Das Waschen des Filters erfolgte 2x 20 min in 2x SSC, 0,1% SDS bei 65°C und 10 min in 0,1% SSC bei 65°C. Abschließend wurde die Membran getrocknet und zur Autoradiographie ein Film aufgelegt.

9. INDUKTION DER SYNTHESE VON RNA UND PROTEINEN IN EINEM T7 EXPRESSIONSSYSTEM

9.1. Beschreibung des T7 Systems von Tabor und Richardson (1985)

In diesem System erfolgt bei Induktion eine selektive Expression von Genen in *E. coli* Zellen durch die T7 RNA-Polymerase. In einer Zelle befinden sich gleichzeitig zwei verschiedene Plasmide, die miteinander kompatibel sind, da sie unterschiedliche "Origins of Replication" besitzen. Das eine Plasmid ist ein T7-Vektor wie pT7-4, pT7-5 oder pT7-6 (Fig. 5) mit dem T7 Promotor Phi 10 (Dunn und Studier, 1983), einem Polylinker, dem für die Resistenz gegen Ampicillin verantwortlichen β -Lactamase-Gen und dem ColE 1 "Origin of replication" aus pBR322 (Sutcliffe, 1979). In den Polylinker können Gene eingebaut werden (z.B. Tet-Gen, 3d^{rst} Gen oder Cat-Gen), die bei Induktion des T7 Systems selektiv exprimiert werden.

Das andere Plasmid pGP1-2 (Fig. 22) enthält das für die T7 RNA-Polymerase kodierende T7 Gen 1 (Nukleotide 3106 bis 5840 aus dem T7 Genom) unter Kontrolle des Lambda P_L Promotors (Shimatake und Rosenberg, 1981). Daneben befinden sich auf pGP1-2 noch das Gen für den temperatursensitiven Lambda-Repressor cI857 (Hecht et al., 1983) unter Kontrolle des *lac* Promotors, das Gen für eine Resistenz gegen Kanamycin und der P15A "Origin of replication" (Chang und Cohen, 1978).

Im nicht induzierten Zustand des Systems bei einer Inkubationstemperatur von 30°C bindet der cI857 Repressor an den Lambda P_L Promotor und verhindert weitgehend die Expression der T7 RNA-Polymerase. Da sich also kaum T7 RNA-Polymerase in der Bakterienzelle befindet, kann somit auch das Gen unter Kontrolle des Phi 10 Promotors auf dem T7 Vektor nicht effizient transkribiert werden.

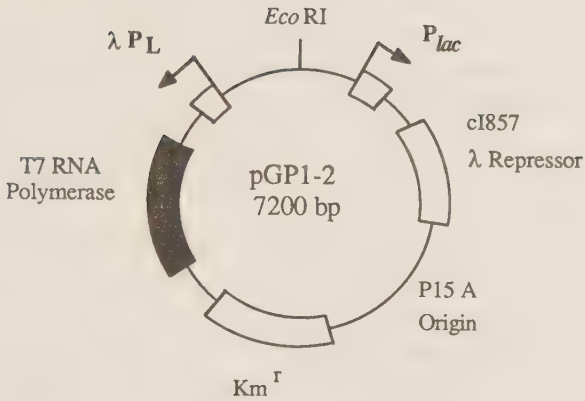


Fig. 22: Schematische Darstellung des Plasmids pGP1-2

Auf dem Plasmid pGP1-2 befindet sich das Gen für die T7 RNA-Polymerase (T7 rp) unter Kontrolle des Lambda P_L Promotors, das Gen für den Lambda-Repressor *cI857* unter Kontrolle des *lac* Promotors, das Gen für eine Kanamycin-Resistenz (*Km^r*) und der P15A "Origin of replication".

Die Induktion des Systems erfolgt durch eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 42°C. Bei dieser Temperatur wird der *cI857* Repressor inaktiviert und damit kann das Gen der T7 RNA-Polymerase exprimiert werden. Bei ausreichender Konzentration von T7 RNA-Polymerase in der Zelle kann das Gen auf dem T7 Vektor unter Kontrolle von $\Phi 10$ mit hoher Effizienz transkribiert werden. Durch Zugabe von Rifampicin kann Transkription durch die zelluläre *E. coli* RNA-Polymerase gehemmt werden, so daß im Bakterium ausschließlich Transkription mit der T7 RNA-Polymerase stattfindet. Auf diese Weise ist eine Überexpression von Genen auf dem T7 Vektor möglich.

9.2. Induktion der RNA-Synthese

Eine 10 mL Kultur, die *E. coli* K38 Bakterien mit pGP1-2 und einem T7 Promotor-Plasmid enthielt, wurde in LB-Medium bei 30°C in Gegenwart von jeweils 50 µg/mL Ampicillin und Kanamycin bis zu einer Zelldichte von $A_{600} \approx 0,5$ inkubiert. Dann wurden 2x 0,5 mL der Bakterien aus der Kultur entnommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt.

Beim Induktionsschritt wurde die Inkubationstemperatur in einem der beiden Gefäße 15 min lang auf 42°C erhöht. Dann erfolgte im Gefäß mit den induzierten Bakterien Zugabe von Rifampicin (Stammlösung: 10 mg/µL in Methanol) bis zu einer Endkonzentration von 200 µg/mL, um die Transkription durch *E. coli* RNA-Polymerase auszuschalten. Nach weiteren 10 min bei 42°C wurden die Bakterien abzentrifugiert.

Das zweite Reaktionsgefäß wurde unterdessen ohne Induktion und Rifampicin-Zugabe bei 30°C belassen und gleichzeitig abzentrifugiert. Die Lysis der Bakterienzellen erfolgte wie in Meth., 8.1. beschrieben.

9.3. Induktion der Proteinsynthese mit [³⁵S]-Methionin-Markierung

(nach S. Tabor, pers. Mitt.)

Das Wachstum der Bakterien in LB-Medium bis $A_{600} \approx 0,5$ bei Gegenwart von jeweils 50 µg/mL Ampicillin und Kanamycin erfolgte wie in Meth., 9.2. beschrieben. Dann wurden 2x 0,2 mL aus der Kultur entnommen und für 5 min bei 10000 Upm und 4°C abzentrifugiert. Das Medium wurde vorsichtig abpipettiert, der Rückstand in 1 mL kaltem M9 Medium (Maniatis *et al.*, 1982) gewaschen und erneut abzentrifugiert.

Nach Resuspension des Niederschlags in 1 mL kaltem M9 Medium mit 20 µg/mL Thiamin und 0,01% einer Mischung aus 18 Aminosäuren (ohne Cystein und Methionin) erfolgte eine weitere Inkubation bei 30°C für 30 bis 60 min.

Eines der beiden Reaktionsgefäße wurde dann zur Induktion für 15 min bei 42°C inkubiert, anschließend erfolgte die Zugabe von Rifampicin (Endkonzentration 200 µg/mL) und eine weitere 10minütige Inkubation bei 42°C. Das zweite Reaktionsgefäß - ohne Induktion - wurde bei 30°C

belassen, es wurde aber zum gleichen Zeitpunkt wie bei den induzierten Bakterien die gleiche Menge an Rifampicin zugegeben.

Nach weiteren 30 min Inkubation bei 30°C erfolgte in beiden Gefäßen ein 5minütiger Puls von jeweils 10 μCi [^{35}S]-Methionin. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert, lysiert und der Extrakt gelektrophoretisch aufgetrennt (vgl. Meth., 5.5.).

9.4. Induktion der Proteinsynthese ohne radioaktive Markierung

(nach S. Tabor, pers. Mitt.; modifiziert)

Bei einigen Experimenten war es erforderlich, durch die Induktion der Bakterien eine maximale Expression des in den T7 Vektor eingebauten Gens zu erreichen. Dies geschah bei einer SDS-Gelelektrophorese ohne radioaktive Markierung der Proteine mit [^{35}S]-Methionin für die nachfolgende quantitative Bestimmung der Synthese des Rif-IIb Proteins mit Antikörpern (vgl. Meth., 11.) und des Cat-Proteins mit Hilfe der Enzym-Aktivität (vgl. Meth., 12.).

Aus einer stationären 10 mL Übernachtskultur bei einer Inkubationstemperatur von 30°C in angereichertem Vollmedium (50 mM Kalium-Phosphat pH 7.2, 2% Bacto-Trypton, 1% Yeast-Extract, 0,5% NaCl, 0,2% Glycerin, sowie jeweils 50 $\mu\text{g/mL}$ Ampicillin und Kanamycin) wurden 2x 0,5 mL entnommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Induktion der Bakterien aus einem der Gefäße erfolgte durch 25minütige Inkubation bei 42°C und anschließende Rifampicin-Zugabe bis zu einer Endkonzentration von 200 $\mu\text{g/mL}$. Nach weiterer 2stündiger Inkubation bei 37°C wurden die induzierten Bakterien - zusammen mit den nicht induzierten (und bei 30°C belassenen) Bakterien - abzentrifugiert. Der aus Bakterienzellen bestehende Rückstand wurde anschließend wie in den entsprechenden Versuchen beschrieben weiterverarbeitet.

10. MESSUNG DER EXPRESSION DES TET-PROTEINS

10.1. Nachweis der Tet-Expression auf Agarplatten

(nach Rauschel, 1985; modifiziert)

Zunächst wurden LB-Agarplatten mit jeweils 50 $\mu\text{g/mL}$ Ampicillin, Kanamycin und einer unterschiedlichen Konzentration von Tetracyclin (0–80 $\mu\text{g/mL}$) hergestellt (vgl. Meth., 1.1.). Aus einer Flüssigkultur des zu untersuchenden Bakterienstamms mit einer Zelldichte $A_{600} \approx 0,3$ wurden 2,5 μL entnommen und mit 10 mL LB-Medium 1:4000 verdünnt. Aus dieser verdünnten Bakteriensuspension wurde Proben von jeweils 15 μL entnommen, auf die LB-Agarplatten mit Tetracyclin ausgestrichen und 20 h lang bei 30°C oder 37°C inkubiert.

Aus der Wachstumsgeschwindigkeit der Bakterien bei verschiedenen Konzentrationen an Tetracyclin, die sich durch einen unterschiedlichen Koloniedurchmesser ausdrückt, konnte auf die Expression des Tet-Proteins in den Zellen geschlossen werden.

10.2. Nachweis der Tet-Expression im Flüssigmedium

Aus einer stationären Übernachtskultur bei 30°C wurden Proben von jeweils 100 μL Bakterien entnommen und in Kolben mit 20 mL LB-Medium und jeweils 50 $\mu\text{g/mL}$ Ampicillin, Kanamycin und einer unterschiedlichen Konzentration an Tetracyclin (0–20 $\mu\text{g/mL}$) pipettiert.

Die Inkubationstemperatur betrug zunächst 30°C. Durch Messung der Absorption bei 550 nm in Abständen von ca. 1h wurde die Wachstumsrate der Bakterien ermittelt. Dadurch war es möglich, die Expression des Tet-Proteins in verschiedenen Bakterienstämmen zu bestimmen.

Nach 4stündigem Wachstum bei 30°C erfolgte der Induktionsschritt bei einigen Ansätzen durch 40minütige Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 42°C. Anschließend erfolgte die Vermehrung dieser Bakterien wieder bei einer Temperatur von 30°C.

11. IMMUNCHEMISCHE MESSUNG DER EXPRESSION DES PROTEINS RIF-IIb

11.1. Lysis der Bakterien

(nach Hüb *et al.*, 1988; Skrobranek, 1988)

Eine 0,5 mL Kultur von induzierten und nicht induzierten Bakterien mit Rif-Plasmiden (vgl. Meth., 9.4.) wurde nach der Abzentrifugation resuspendiert in 500 μ L Lysis-Puffer A (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1 mM Aminoacetonitrilhydrogen-sulfat, 10% Glycerin, 0,5% Nonidet-P 40). Die Zellen wurden dann nach Zugabe von 2,5 mg Lysozym 15 min lang auf Eis stehen gelassen. Die Lysis der Bakterien geschah durch Behandlung mit Ultraschall. Nach weiteren 15 min auf Eis wurden 0,5 mL Q-Sepharose FF (equilibriert in Lysis-Puffer A) zugegeben und 2 h lang bei 4°C geschüttelt. Nach Abzentrifugation wurde der Rückstand in 500 μ L Lysis-Puffer B (wie Lysis-Puffer A, nur 500 mM NaCl, statt 50 mM) aufgenommen und 15 min lang bei 4°C geschüttelt. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde der Überstand, in dem sich das Protein Rif-IIb befinden sollte, abpipettiert. 30 μ L des Überstands wurden dann mit 20 μ L Protein-Lysis-Puffer (vgl. Meth., 5.5.) versetzt und nach Denaturierung bei 95°C auf ein Polyacrylamid-SDS-Gel aufgetragen.

11.2. Western Blot

(nach Biometra-Vorschrift)

Beim Western-Blot erfolgt ein Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Burnette, 1981). Dies geschah hier durch Elektroblothing mit der Biometra Fast Blot Apparatur. Nach Polyacrylamid-SDS-Elektrophorese in Gegenwart von farbigen Markerproteinen wurde Gel zurechtgeschnitten und 5 min lang in Blot-Puffer pH 8.3 (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10% Methanol) äquilibriert. Auf die Elektrodenplatte wurden drei Lagen feuchte Whatman 3 MM Papiere - genau in der Größe des Gels - gelegt, darauf das Gel und eine mit Blot-Puffer befeuchtete Nitrocellulose-Membran (ebenfalls in der Größe des Gels) und nochmals drei Lagen Whatman 3 MM Papier.

Der Transfer wurde 20 min lang bei einer Stromstärke von 60 mA und einer Spannung von 300 V durchgeführt.

11.3. Nachweis der Proteinexpression mit Antikörpern

(nach Skrobranek, 1988)

Die Nitrocellulose-Membran wurde nach dem Western-Blot 90 min lang in ca. 25 mL TBS-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl) mit 5% Rinderserum-Albumin inkubiert und dann 2x für 10 min in TBS-Puffer gewaschen.

Anschließend erfolgte eine 2stündige Inkubation der Membran mit 0,5 mL einer Lösung von nicht gereinigtem Kaninchen-Antikörper gegen Rif-IIb und 25 mL TBS-Puffer mit 1% Rinderserum-Albumin. Danach wurde wiederum 2x für 10 min mit TBS-Puffer gewaschen.

Nach 60minütiger Inkubation mit 40 μ L einer [125 J] Protein A Lösung in 25 mL TBS-Puffer mit 1% Rinderserum-Albumin wurde abschließend noch 2x mit TBS-Puffer gewaschen. Die Membran wurde an der Luft getrocknet und ein Film für die Autoradiographie aufgelegt.

12. MESSUNG DER ENZYMATISCHEN AKTIVITÄT VON CAT IN BAKTERIENEXTRAKTEN

12.1. Lysis der Bakterien

Kulturen von 200 μ L induzierten und nicht induzierten Bakterien (nach Meth., 9.4.) mit Cat-Plasmiden wurden abzentrifugiert und der Rückstand in 500 μ L 250 mM Tris-HCl pH 7.8 resuspendiert. Die Lysis der Zellen erfolgte durch Ultraschallbehandlung (4x 30 sec. bei 60 W) auf Eis.

Der auf diese Weise hergestellte bakterielle Rohextrakt wurde sofort für den Cat-Aktivitätstest eingesetzt.

12.2. Cat-Aktivitätstest

(nach Gorman *et al.*, 1982; modifiziert)

Ein Standard-Ansatz zur Messung der Aktivität von Chloramphenicol-Acetyltransferase aus Bakterienextrakten enthielt in 150 μL Reaktionsvolumen 110 μL 250 mM Tris-HCl pH 7,8, 20 μL Acetyl-Coenzym A (4 mM) in H_2O , 1 μCi [Dichloroacetyl-1,2- ^{14}C] Chloramphenicol (60 mCi/mmol) und 10 μL Rohextrakt aus Bakterien (1:10 verdünnt) oder 2 μL Chloramphenicol-Acetyltransferase (3 Einheiten).

Alle Komponenten mit Ausnahme der Acetyl-CoA Lösung wurden zusammenpipettiert und 5 min lang bei 37°C vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Acetyl-CoA gestartet und ebenfalls bei 37°C durchgeführt. Nach einer jeweils angegebenen Inkubationsdauer wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mL eiskaltem Essigsäureethylester und Schütteln beendet.

Dabei erfolgte eine Überführung der radioaktiven Reaktionskomponenten (Chloramphenicol und seine acetylierten Derivate) in die organische Phase. Der Essigsäureethylester wurde anschließend von der wässrigen Phase abgetrennt und im Speed Vac Concentrator bis zur Trockenheit gebracht. Der feste Rückstand wurde in 30 μL Essigsäureethylester aufgenommen und vorsichtig auf eine Kieselgel-Dünnschicht-Platte von Merck zur Chromatographie aufgetragen.

Die Durchführung der DC-Chromatographie erfolgte in einem Fließmittel aus 95% Chloroform und 5% Methanol. So gelang es, Chloramphenicol und seine acetylierten Derivate (1-Acetyl-CM, 3-Acetyl-CM und 1,3-Diacetyl-CM) aufzutrennen.

Die Chromatographie wurde beendet, wenn das Fließmittel nahe am oberen Rand der Kieselgel-Platte angekommen war. Nach Trocknen der Platte wurde bei Raumtemperatur ein Röntgenfilm zur Autoradiographie aufgelegt.

ERGEBNISSE

1. UNTERSUCHUNGEN ZUR TERMINATION *IN VITRO*

1.1. Termination an synthetischen Oligonukleotiden

In meiner Arbeit sollte als erstes untersucht werden, ob das 58 bp lange synthetische Oligonukleotid T bei einer *in vitro* Transkription mit T7 RNA-Polymerase als Terminationssignal wirken kann. Das Fragment T (Fig. 2) enthält genau den Abschnitt des T7 Genoms (die Nukleotide 24164 bis 24214), auf dem sich ein palindromer Sequenzbereich gefolgt von 6 T-Resten im Bereich des späten T7 Terminators TPhi befindet (Dunn und Studier, 1983). Das Fragment T erstreckt sich somit über einen Abschnitt von -45 bis +5 bezüglich des Nukleotids 24209 auf dem T7 Genom, an dem die Termination bei TPhi stattfindet (Dunn und Studier, 1983). Am 5'-Ende von T befindet sich eine *SacI* - und am 3'-Ende eine *EcoRI* Restriktionsschnittstelle.

Das Fragment T wurde in den T7 Vektor pT7-4 (Fig. 5) kloniert, das entstehende rekombinante Plasmid wurde pT7-4T bezeichnet (Fig. 6). Die Produkte der RNA-Synthese an den mit *XmnI* linearisierten Plasmiden pT7-4 und pT7-4T sollten bei einer *in vitro* Transkription verglichen werden. Nach Beendigung der Inkubation erfolgte eine Auftrennung der Reaktionsprodukte über ein Polyacrylamid-Harnstoff-Gel (vgl. Meth., 5.4. und 8.1.). Als Ergebnis der Autoradiographie wurde gefunden, daß beim Experiment mit pT7-4T/*XmnI* zwei RNA-Banden auf dem Gel zu sehen sind (Fig. 23, Spuren 4, 5 und 6). Die langsamer wandernde RNA A besitzt eine wesentlich höhere Intensität als die schneller wandernde RNA B. Mit zunehmender Dauer der Inkubation nimmt die Intensität beider Banden im gleichen Maß zu. Beim Experiment mit pT7-4/*XmnI* ist dagegen nur eine Bande C mit hoher Intensität zu sehen, die etwas schneller wandert als die intensivere Bande A bei pT7-4T (Fig. 23, Spuren 1, 2, und 3).

Ein Mobilitätsvergleich mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten von bekannter Länge zeigt, daß A und C zwischen 400 und 550 nt. lang sind (Fig. 23). Dieser Befund legt die Deutung nahe, daß es sich bei A und C um "Run off" Transkripte handelt.

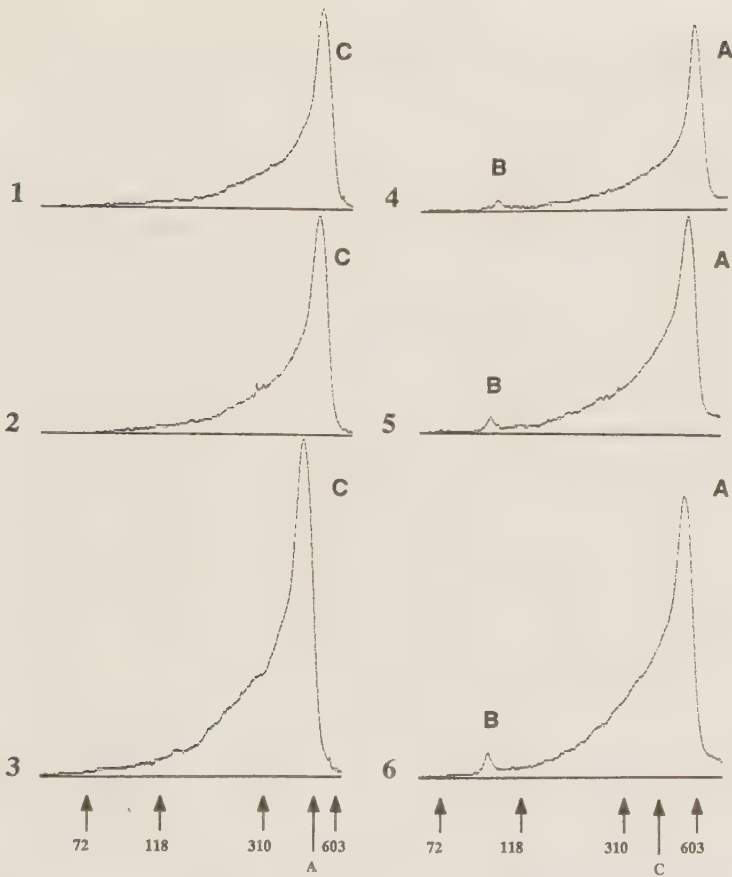


Fig. 23: Vergleich der *in vitro* RNA-Synthese an den mit *XmnI* geschnittenen Plasmiden pT7-4 und pT7-4T

Die Reaktionsprodukte wurden in einem 8%igen Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetrennt. Als Längenstandard diente radioaktiv markierte PhiX174/*HaeIII* DNA. Bei den Banden A und C handelt es sich um die 505 bzw. 457 nt. langen *XmnI* "Run off" Transkripte an pT7-4 und pT7-4T. Bei B handelt es sich um eine ca. 100 nt. lange ausschließlich an pT7-4T entstehende Terminations-RNA (vgl. Fig. 24).

Bei der densitometrischen Auswertung wurde auf allen Spuren ein gleicher Standard (entsprechend 100%) verwendet.

1: pT7-4/*XmnI* (5 min)

4: pT7-4T/*XmnI* (5 min)

2: pT7-4/*XmnI* (10 min)

5: pT7-4T/*XmnI* (10 min)

3: pT7-4/*XmnI* (15 min)

6: pT7-4T/*XmnI* (15 min)

"Run off" Transkripte sind RNA-Moleküle, die von der Initiationsstelle der Transkription bis zu dem, durch die Restriktionsschnittstelle bestimmten, Ende der Matrize reichen.

Die Initiation der RNA-Synthese an pT7-4 findet bei Position 57 in Richtung kleinere Nummern statt (S.Tabor, pers. Mitt.). Das Plasmid pT7-4 ist 2388 bp lang. Die Zählung der Plasmidbasenpaare beginnt bei 0/2388, der Symmetrieachse der *EcoRI* Schnittstelle. Die *XmnI* Schnittstelle auf pT7-4 befindet sich bei Position 1988 (Fig. 24). Daher sollte das bei der RNA-Synthese an pT7-4/*XmnI* entstehende Transkript C 457 nt. ($57 + 2388 - 1988$) lang sein (Fig. 24).

Bedingt durch die Insertion von T (58 bp) und der Deletion der Nukleotide zwischen der *SacI* und der *EcoRI* Schnittstelle auf pT7-4 (10 bp) sollte das an pT7-4T/*XmnI* entstehende Transkript A dann 505 nt. ($57 + 58 - 10 + 2388 - 1988$) lang sein (Fig. 24). Tatsächlich besitzt auch die RNA A eine etwas geringere Mobilität als C (Fig. 23), was diese Argumentation unterstützt. Auch ist das Erscheinen dieser "Run off" Transkripte bei einer *in vitro* RNA-Synthese an geschnittenen DNA-Matrizen gut dokumentiert (Little und Jackson, 1988).

Das Vorhandensein einer schneller als das "Run off" Transkript wandernden RNA B an pT7-4T/*XmnI* ist offenbar eine Konsequenz der Insertion von T. Die Länge von B beträgt nach Vergleich mit der Mobilität von DNA-Markern ca. 90 bis 110 nt.. Die RNA B sollte durch ein Terminationseignis entstanden sein, da auf der Matrize keine weitere zu einem T7 Promotor homologe Nukleotidsequenz existiert, von dem ein kürzeres "Run off"-Transkript stammen könnte (S. Tabor, pers. Mitt.). Da man auch bei zunehmender Inkubationsdauer keine Änderung im Verhältnis der Intensität von "Run off"- (A) und kürzerer RNA (B) erkennen kann, ist es auch unwahrscheinlich, daß es sich bei B um das Produkt einer Nuklease-Abbaureaktion handelt.

Zur Überprüfung dieses Befunds wurde eine Transkription an mit *EcoRI* geschnittenem pT7-4T durchgeführt. Auch an dieser Matrize war eine Bande (Fig. 25, Spur 1) mit gleicher Mobilität wie die Terminations-RNA B an pT7-4T/*XmnI* zu sehen (Fig. 25, Spur 2). Das *XmnI* "Run off" Transkript A (Fig. 25, Spur 2) verschwindet dagegen bei Schnitt der Matrize mit *EcoRI* (Spur 1) und eine neue Bande D, die knapp oberhalb von B wandert, tritt neu auf (Fig. 25, Spur 1).

Die zur Kontrolle durchgeführte RNA-Synthese an pT7-4/*EcoRI* (Fig. 25, Spur 3) zeigt nur eine intensive Bande E, die erheblich schneller wandert als B und D (Spur 1).

Dieses Ergebnis unterstützt die Deutung des ersten Experiments (Fig. 23), denn die Banden A und C, bei denen vermutet wurde, daß es sich um "Run off" Transkripte bis zur *XmnI* Schnittstelle handelt, verschwinden bei Restriktionsschnitt der Matrize mit einem anderen Enzym. Dagegen bleibt die vermutlich durch Termination entstandene Bande B unabhängig von der Art des Restriktionsschnitts erhalten. Die neu auftretenden RNA-Moleküle D und E können wiederum als "Run off" Transkripte vom T7 Promotor bis zur *EcoRI* Schnittstelle interpretiert werden. Die Restriktionsschnittstelle für *EcoRI* liegt an Position 2386 von pT7-4 (Fig. 24A). Bei Start der RNA-Synthese an Phi 10 (Position 57) sollten die an pT7-4/*EcoRI* bzw. pT7-4T/*EcoRI* entstehenden "Run off" Transkripte (E und D) 59 nt. bzw. 107 nt. (59 + 58 -10) lang sein (Fig. 24A).

Die durch Termination an pT7-4T entstehende RNA B wandert nur um wenig schneller als das *EcoRI* "Run off" Transkript D (Fig. 25, Spur 1). Da die Schnittstelle für *EcoRI* auf pT7-4T direkt nach Ende der Insertion T folgt (Fig. 6), muß die Termination der RNA-Synthese kurz vor dieser Schnittstelle am Ende des Fragments T stattfinden.

Da die Intensität der Terminations-RNA B erheblich geringer ist als die der "Run off" Transkripte A oder D, erfolgt die Termination der RNA-Synthese durch das Fragment T nur ineffizient.

Es stellte sich nun die Frage, ob eine Termination an T auch bei Verwendung einer ungeschnittenen DNA-Matrize stattfinden kann. Dazu wurden die Produkte einer RNA-Synthese an den Plasmiden pTet-4 und pTet-4T analysiert (Fig. 17B,D). Das Plasmid pTet-4 enthält in seinem Polylinker eine 1,4 kb lange Insertion mit dem Tetracyclin-Resistenzgen aus pBR322. pTet-4T (Fig. 17D) unterscheidet sich von pTet-4 nur durch die Anwesenheit des DNA-Fragments T hinter der Tet-Insertion.

Bei RNA-Synthese an ungeschnittenem pTet-4T (Fig. 26, Spur 2) ist eine breite diffuse Spur von unterschiedlich langen Transkripten zu sehen. Das Entstehen dieser Art von RNA-Molekülen ohne definiertes 3'-Ende bei Verwendung einer ungeschnittenen DNA-Matrize ist bei Little und Jackson (1988) beschrieben und wird offenbar durch unspezifische, "katastrophale" Termination der RNA-Synthese hervorgerufen ("early quitters").

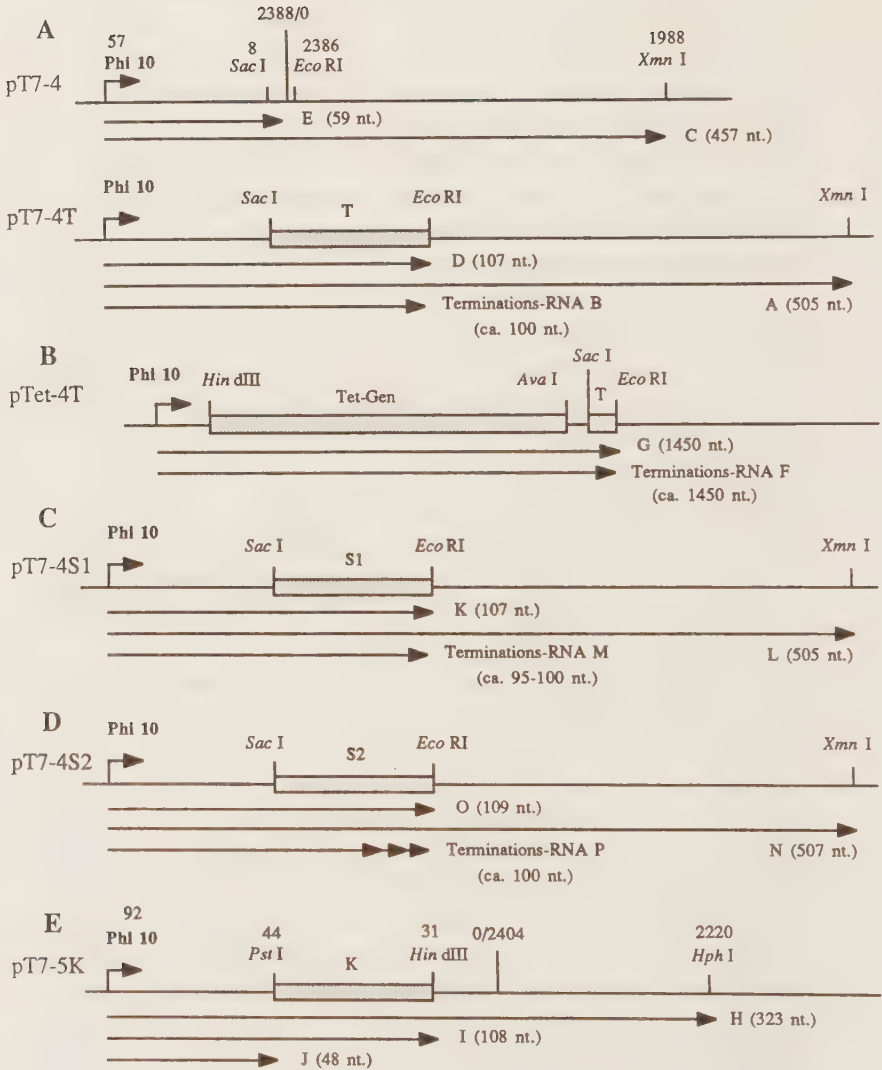


Fig. 24: Schematische Darstellung der Termination an den synthetischen Oligonukleotiden T, K, S1 und S2

Legende von Fig. 24:

A) Termination an pT7-4T

Die Transkription bei pT7-4 startet an Phi 10 (Position 57) in Richtung von kleineren Nummern. Die Position 0/2388 von pT7-4 stellt die Symmetrieachse der *EcoRI* Stelle dar.

Die "Run off" Transkripte C pT7-4 (bis zur *XmnI* Stelle bei 1988) und E (bis zur *EcoRI* Stelle bei 2386) sind 457 nt. (C) und 59 nt. (E) lang. Bedingt durch Insertion des Fragments T (58 bp) und Deletion der Nukleotide zwischen *SacI* und *EcoRI* Stelle (10 bp) sind die "Run off" Transkripte an pT7-4T A (bis zur *XmnI* Stelle) und D (bis zur *EcoRI* Stelle) 505 nt. (A) und 107 nt. (D) lang.

Durch Termination entsteht an pT7-4T eine ca. 100 nt. lange RNA B.

B) Termination an pTet-4T

Die Transkription startet an Phi 10. Das "Run off" Transkript G bis zur *EcoRI* Stelle sollte auf Grund der Tet-Insertion (1,4 kb) eine Länge von 1450 nt. besitzen.

Durch Termination entsteht ein Transkript F mit ebenfalls ca. 1450 nt. Länge an pTet-4T ohne Restriktionsschnitt.

C) Termination an pT7-4S1

Die Länge der "Run off" Transkripte an pT7-4S1 L (bis zur *XmnI* Stelle) und K (bis zur *EcoRI* Stelle) sollte - bedingt durch die gleiche Länge der Insertionen T und S1 - wie an pT7-4T 505 nt. (L) und 107 nt. (K) betragen.

Durch Termination an pT7-4S1 entsteht das Transkript M mit ca. 95 - 100 nt. Länge.

D) Termination an pT7-4S2

Die Länge der "Run off" Transkripte an pT7-4S2 N (bis zur *XmnI* Stelle) und O (bis zur *EcoRI* Stelle) sollte - bedingt durch die Insertion S2 um 2 Basen länger als an pT7-4T - 507 nt. (N) und 109 nt. (O) betragen.

Durch Termination an pT7-4S2 entsteht eine Bande P (aus mehreren schwachen Transkripten) um ca. 100 nt. Länge.

E) Termination an pT7-5K

Die Transkription bei pT7-5 startet an Phi 10 (Position 92) in Richtung von kleineren Nummern. Die Zählung bei pT7-5 beginnt bei Position 0/2404. Schnittstellen für *PstI*, *HindIII* und *HphI* befinden sich an den Positionen 31, 44 bzw. 2220.

Das "Run off" Transkript J bis zur *PstI* Stelle ist daher 48 nt. lang.

Bedingt durch die Insertion K (60 bp) und die Deletion der Nukleotide zwischen *PstI* und *HindIII* Stelle (13 bp) beträgt die Länge der "Run off" Transkripte H (bis zur *HphI* Stelle) und I (bis zur *HindIII* Stelle) 323 nt. (H) und 108 nt. (I).

Eine Termination wurde nicht beobachtet.

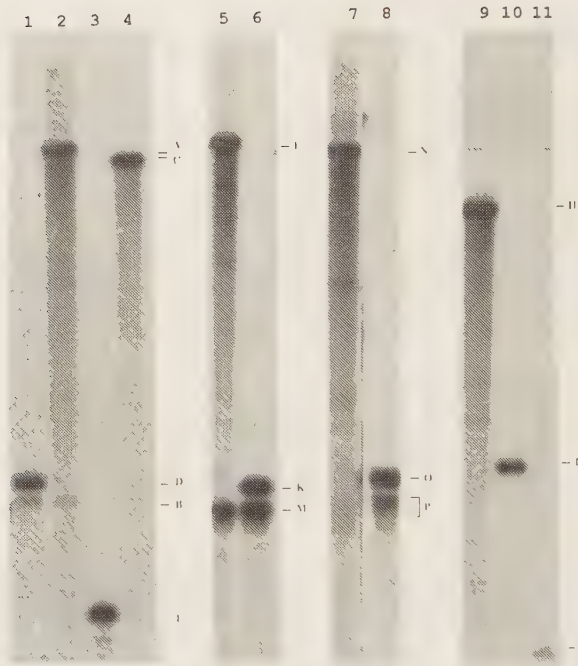


Fig. 25: *In vitro* RNA-Synthese an den Plasmiden pT7-4, pT7-4T, pT7-4S1, pT7-4S2 und pT7-5K

Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte in einem 4%igen Polyacrylamid-Harnstoff-Gel. Alle auftretenden Banden sind im Text und in Fig. 24 beschrieben.

- | | |
|--------------------------|-----------------------------|
| 1: pT7-4T/ <i>Eco</i> RI | 2: pT7-4T/ <i>Xmn</i> I |
| 3: pT7-4/ <i>Eco</i> RI | 4: pT7-4/ <i>Xmn</i> I |
| 5: pT7-4S1/ <i>Xmn</i> I | 6: pT7-4S1/ <i>Eco</i> RI |
| 7: pT7-4S2/ <i>Xmn</i> I | 8: pT7-4S2/ <i>Eco</i> RI |
| 9: pT7-5K/ <i>Hph</i> I | 10: pT7-5K/ <i>Hind</i> III |
| 11: pT7-5K/ <i>Pst</i> I | |

Innerhalb der diffusen RNA-Spur ist bei pTet-4T aber eine deutliche Bande F zu erkennen. Bei F muß es sich um eine RNA-Spezies mit definiertem 3'-Ende handeln, die nur durch spezifische Termination an einer bestimmten Stelle auf der Matrize entstehen kann. Bei Transkription an pTet-4 ist dagegen nur eine breite diffuse RNA-Spur ohne definierte Bande (auf dem Original-Autoradiogramm besser erkennbar als auf dem Densitogramm) zu sehen (Fig. 26, Spur 1). Durch Insertion des Fragments T findet also auch an einer ungeschnittenen Matrize das Auftreten einer neuen RNA-Spezies - bedingt durch spezifische Termination - statt.

Die Längenbestimmung der Terminations-RNA F erfolgte durch Vergleich mit dem Produkt einer RNA-Synthese an mit *EcoRI* geschnittenem pTet-4 (Fig. 26, Spur 3). Dabei wird als längste RNA eine Bande G beobachtet, bei der es sich um ein "Run off" Transkript vom Promotor Phi 10 bis zur Schnittstelle für *EcoRI* (hinter der Tet-Insertion) handelt. Die Länge von G muß daher ca. 1450 nt. betragen (Fig. 24B). Die Mobilität von G (Fig. 26, Spur 3) entspricht genau der durch Termination entstehenden RNA F (Fig. 26, Spur 2). Die Länge von F sollte daher ebenfalls ca. 1450 nt. betragen, was auf eine Termination am Ende der Tet-Insertion im Bereich des Fragments T hindeutet.

Die diffuse RNA-Spur bei pTet-4T oberhalb der Terminations-RNA F (Fig. 26, Spur 2) stammt von RNA-Molekülen, die durch Überlesen des Terminators entstehen. Das Auftreten dieser längeren Transkripte zeigt, daß die Termination der *in vitro* RNA-Synthese durch das Fragment T auch an ungeschnittener Matrize nur ineffizient ist.

Als nächstes wurde untersucht, ob das DNA-Fragment mit einer zum Fragment T transversen Nukleotidsequenz (Shortle *et al.*, 1981) noch als Terminationssignal für die *in vitro* Transkription mit der T7 RNA-Polymerase dienen kann. Bei K sind alle aus T7 stammenden Nukleotide des Fragments T durch ihre komplementären Gegenstücke vertauscht (Fig. 2). K enthält somit einen genau 50 bp langen Bereich mit der zu T transversen DNA-Sequenz und wird 5'-seitig von einer Schnittstelle für *PstI* und 3'-seitig von einer Schnittstelle für *HindIII* begrenzt.

Das Fragment K wurde in den Vektor pT7-5 eingebaut. Das rekombinante Plasmid pT7-5K (Fig. 6) wurde als Matrize bei *in vitro* Transkription mit T7 RNA-Polymerase verwendet.

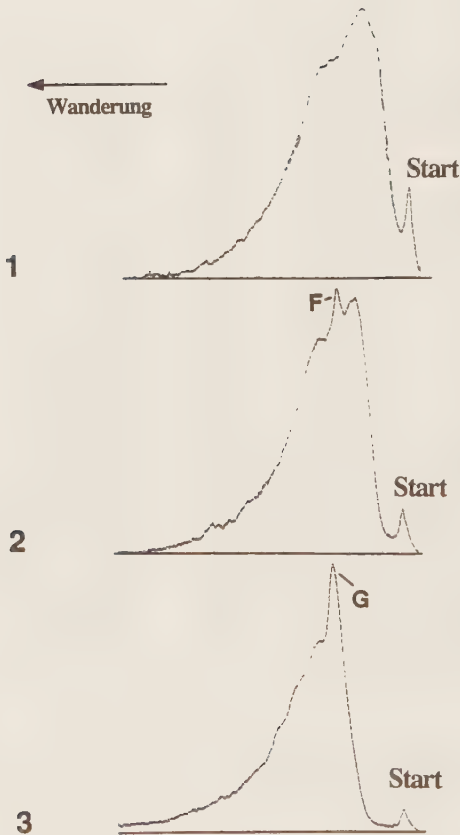


Fig. 26: Vergleich der *in vitro* RNA-Synthese an den Plasmiden pTet-4 und pTet-4T

Die Auftrennung der Reaktionsprodukte geschah in einem 8%igen Polyacrylamid-Harnstoff-Gel. Bei der Bande G handelt es sich um ein "Run off" Transkript von Phi 10 bis zur *EcoRI* Stelle. Die Bande F entsteht durch Termination an pTet-4T, während an pTet-4 keine Termination gefunden wird (vgl. Fig. 24).

1: pTet-4

2: pTet-4T

3: pTet-4/*EcoRI*

Bei Transkription an mit *HphI*, *HindIII* oder *PstI* geschnittenem pT7-5K war auf jeder Spur jeweils nur eine Bande zu sehen (Fig. 25, Spuren 9, 10 und 11). Die Mobilität der Bande H bei pT7-5K/*HphI* war am geringsten, dann folgte die Bande I bei pT7-5K/*HindIII*, während die nur schwache Bande J bei pT7-5K/*PstI* am schnellsten wanderte. *PstI* und *HindIII* besitzen jeweils eine Schnittstelle auf dem 2404 bp langen Plasmid pT7-5, an den Positionen 34 bzw. 44 innerhalb des Polylinkers. *HphI* hat mehrere Schnittstellen auf pT7-5, die dem T7 Promotor am nächsten gelegene und somit die Transkription beendende Stelle befindet sich an Position 2220. Das Auftreten von H, I und J war von der Art des Restriktionsschnitts abhängig, deshalb sollte es sich dabei - entsprechend den vorherigen Experimenten - um "Run off" Transkripte handeln.

Die RNA-Synthese am T7 Promotor Phi 10 auf pT7-5K beginnt an Position 92 in Richtung kleinere Nummern (S. Tabor, Pers. Mitt.) Damit ist es möglich, die Länge der "Run off" Transkripte zu errechnen. J sollte 48 nt. sein ($92 - 44$). Bedingt durch die Insertion K (60 nt.) und die Deletion der Nukleotide zwischen *HindIII* und *PstI* Stelle (13 nt.) beträgt die Länge von H 323 nt. ($92 + 60 - 13 + 2404 - 2220$) und von I 108 nt. ($92 + 60 - 13 - 31$) (Fig. 24).

Bei allen drei Spuren waren keine weiteren Banden zu beobachten, bei denen es sich um Terminations-Transkripte handeln könnte. Das DNA-Fragment K, das eine zum natürlichen T7 Terminator transverse Nukleotidsequenz besitzt, kann bei *in vitro* Transkription mit T7 RNA-Polymerase nicht als Terminator wirken. Dies ist der Fall, obwohl ein Transkript an pT7-5K eine thermodynamisch stabile RNA-Sekundärstruktur - allerdings ohne die 3'-stromabwärts liegende Folge von U-Resten - ausbilden kann (vgl. Fig. 58).

Um zu untersuchen, welchen Einfluß Veränderungen in der Nukleotidsequenz des Fragments T auf seine Wirkung als Terminator der RNA-Synthese haben, wurden zwei neue synthetische DNA-Fragmente hergestellt. Die Basenfolge der Fragmente S1 und S2 leitet sich ebenfalls vom späten T7 Terminator TPhi ab. Im Unterschied zu T wurden jedoch bei S1 und S2 Mutationen in die natürliche, eine Termination bewirkende, Nukleotidsequenz des T7 Genoms eingeführt.

Im Bereich der palindromen Nukleotidsequenz des Terminators TPhi und des synthetischen Fragments T kann ein Transkript eine RNA-Haarnadel-

Sekundärstruktur ausbilden. Diese Haarnadel-Struktur besitzt keine perfekte Basenpaarung, es sind in ihr 5 rG-rU Basenpaare enthalten (vgl. Fig. 57). rG-rU Hybrid-Basenpaare leisten keinen Beitrag zur thermodynamischen Stabilität einer RNA-Sekundärstruktur (Tinoco *et al.*, 1973). Bei dem synthetischen Fragment S1 (Fig. 2) sollten sich nun durch Basenaustausch an Stelle dieser rG-rU Hybride thermodynamisch sehr stabile rG-rC Basenpaare ausbilden können. Dazu wurden die T-Reste auf dem kodierenden DNA-Strang des Fragments T an Position 18, 25, 35, 37 und 38 durch C-Reste ausgewechselt. Ebenso erfolgte ein Austausch der entsprechenden A-Reste auf dem nicht-kodierenden DNA-Strang von T durch G-Reste.

Das Fragment S1 wurde in den Vektor pT7-4 eingebaut. Dabei entstand das rekombinante Plasmid pT7-4S1 (Fig. 6). Die Produkte einer *in vitro* RNA-Synthese an pT7-4S1 wurden mit denen an pT7-4T verglichen. An mit *EcoRI* (Fig. 25, Spur 6) und *XmnI* (Fig. 25, Spur 5) geschnittenem pT7-4S1 sind drei intensive Banden K, L und M zu erkennen. Dabei treten K und L immer nur jeweils auf einer Spur - abhängig von der Art des Restriktionsschnitts - auf. Deshalb sollte es sich bei ihnen um *EcoRI* bzw. *XmnI* "Run off" Transkripte handeln. Die RNA-Moleküle K und L müssen - auf Grund der gleichen Länge der Insertionen S1 und T - ebenso wie die "Run off" Transkripte D und A an pT7-4T 107 nt. (K) bzw. 505 nt. (L) lang sein (Fig. 24, A und C).

Es wird auch gefunden, daß die beiden *EcoRI* "Run off" Transkripte K und D dieselbe Mobilität besitzen. Hingegen wandert das *XmnI* "Run off" Transkript L an pT7-4S1 etwas langsamer als das - nach der Nukleotidsequenz der Matrizen gleich lange - Transkript A an pT7-4T/*XmnI*.

Dieser Befund ist vermutlich auf eine nicht-denaturierbare Sekundärstruktur bei an pT7-S1 entstehenden Transkripten zurückzuführen (vgl. Erg., 1.5.).

Die Bande M tritt dagegen auf beiden Spuren 5 und 6 unabhängig von der Art des Restriktionsschnitts auf. Daher sollte es sich bei M um ein durch spezifische Termination entstehendes RNA-Molekül handeln. M besitzt eine etwas höhere Mobilität als B, die Terminations-RNA an pT7-4T (Fig. 25, Spur 1). Die Terminationsstelle auf pT7-4S1 sollte aber wie auf dem Fragment T gegen Ende der Insertion S1 liegen (Fig. 24C), da auch hier nur ein geringer Abstand zwischen dem *EcoRI* "Run off" Transkript K und der Terminations-RNA M zu beobachten ist (Fig. 25, Spur 6).

Die Intensität der durch Termination an pT7-4S1 entstehenden RNA M ist nur etwas geringer als die Intensität der "Run off" Banden K und L (Fig. 25, Spuren 5 und 6). Somit ist die Termination der Transkription auf dem DNA-Fragment S1 ganz erheblich effizienter als die Termination auf dem DNA-Fragment T (Fig. 25, Spuren 1 und 2).

Die zweite Modifizierung des DNA-Fragments T geschah durch Verlängerung der Folge von 6 T-Resten um zwei weitere T-Reste bei dem DNA-Fragment S2 (Fig. 2). Eine weitere Veränderung - im Vergleich zum Fragment T - ist ein Basenaustausch im kodierenden DNA-Strang von T nach A bei Position 10 (Fig. 2), der eine Verlängerung der RNA-Haarnadelstruktur eines Transkripts im Bereich von S2 um ein Basenpaar zur Folge hat.

Das DNA-Fragment S2 wurde in den Vektor pT7-4 (Fig. 5) eingebaut und das rekombinante Plasmid pT7-S2 bezeichnet (Fig. 6). Nach Restriktionsschnitt mit *XmnI* oder *EcoRI* wurde pT7-4S2 als Matrize für eine *in vitro* Transkription eingesetzt. Bei pT7-4S2/*XmnI* (Fig. 25, Spur 7) ist eine intensive Bande N mit gleicher Mobilität wie das *XmnI* "Run off" Transkript A an pT7-4T (Spur 2) zu sehen. Bei pT7-4S2/*EcoRI* (Spur 8) ist eine intensive Bande O zu sehen, die etwas langsamer als das "Run off" Transkript D an pT7-4T (Spur 1) wandert. Weil das Auftreten dieser beiden Banden von der Art des Restriktionsschnitts abhängig ist, sollte es sich bei diesen RNAs - ebenso wie an pT7-4T oder pT7-4S1 - um "Run off" Transkripte handeln. Ihre Länge sollte - entsprechend der Nukleotidsequenz der Insertion S2 - 505 nt. bei N bzw. 105 nt. bei O betragen (Fig. 24D). Die Bande P, bei der es sich nicht um eine einzelne, sondern um mehrere schwächere Banden handelt, ist deutlich auf Spur 8, aber kaum auf Spur 7 zu beobachten. P wandert auf Höhe der Terminations-RNAs B an pT7-4T (Spuren 1 und 2) und M an pT7-4S1 (Spuren 5 und 6), knapp unterhalb des *EcoRI* "Run off" Transkripts O (Spur 8). Daher sollte P - entsprechend den Banden B und M - durch eine spezifische Termination der RNA-Synthese am Ende des DNA-Fragments S2 entstehen (Fig. 24D).

Die Termination der RNA-Synthese auf S2 findet offenbar wie auf T oder S1 gegen Ende der Insertion statt. Da es sich bei P um mehrere Banden handelt, befindet sich jedoch auf S2 keine eindeutige Haupt-Terminationsstelle, sondern mehrere Terminationsstellen. Die Intensität von P ist erheblich geringer als die der "Run off" Transkripte N oder O. Gegenüber pT7-4T (Fig. 26, Spuren 1 und 2) ist an pT7-4S2 bei Verwendung der mit *EcoRI* geschnittenen Matrize (Spur 8) eine deutliche Erhöhung, aber bei der mit *XmnI* geschnittenen Matrize (Spur 7) keine Verbesserung der Termination zu beobachten.

Es findet also eine Termination der *in vitro* Transkription auch auf den modifizierten DNA-Fragmenten S1 und S2 statt. Dabei hat die Art der Modifizierung bei S1 und S2 eine unterschiedliche Auswirkung auf die Terminationseffizienz. Die Verlängerung der 6 T-Reste am Ende des Palindroms um weitere 2 T-Reste bei S2 hat keine eindeutige Verbesserung im Vergleich zum Fragment T, sondern ein "Stottern" der Termination zur Folge. Dagegen bringt bei S1 die Stabilisierung der potentiellen RNA-Haarnadelstruktur, die ein Transkript innerhalb der palindromen DNA-Sequenz ausbilden kann, eine drastische Erhöhung der Terminationseffizienz.

1.2. Termination an DNA-Fragmenten aus T7

Die Nukleotidsequenz der synthetischen DNA-Fragmente T, K, S1 und S2 (vgl. Erg., 1.1.) leitet sich von einem 50 bp langen Abschnitt der T7 Terminationsstelle TPhi ab (Fig. 1). Carter *et al.* (1981) fanden mit einem 1,4 kb langen Fragment an TPhi *in vitro* eine Terminationseffizienz von 90 %. Im Gegensatz dazu war die Termination am nur 50 bp langen synthetischen DNA-Fragment T nur sehr ineffizient (vgl. auch Erg., 1.1.). Auf dem in T enthaltenen Bereich von TPhi liegen allerdings die wesentlichen Elemente eines *E. coli* Terminators: die palindrome DNA-Sequenz gefolgt von einer T-reichen Region (Rosenberg und Court, 1979). Deshalb sollte untersucht werden, ob ein längeres T7 DNA-Fragment, welches den Terminator TPhi enthält, die RNA-Synthese unter gleichen Reaktionsbedingungen wirklich deutlich besser als das synthetische Fragment T terminieren kann.

Das 742 bp lange DNA-Fragment *Cla* C/*Hpa* B von Position 23566 bis 24308 auf dem T7 Genom enthält den Bereich der Terminationsstelle TPhi

(Fig. 8) bei Position 24209 von T7 (Dunn und Studier, 1983). Durch Klonierung dieses Fragments in den Vektor pT7-4 wurde das rekombinante Plasmid pT7-4CB konstruiert (Fig. 8). Die Insertion *Cla C/Hpa B* in pT7-4CB besitzt dabei die gleiche Orientierung bezüglich des T7 Promotors Phi 10 wie auf dem T7 Genom (Meth., 6.2., Fig. 8).

Bei *in vitro* Transkription an ungeschnittenem pT7-4CB ist neben der für ungeschnittene Matrizen typischen diffusen RNA-Spur (vgl. Fig. 26, Spuren 1 und 2) eine intensive Bande A zu sehen (Fig. 27, Spur 2). Das Transkript A muß durch spezifische Termination entstanden sein, da an einer ungeschnittenen Matrize keine "Run off" Transkripte auftreten können. Bei einem Kontrollexperiment an mit *EcoRI* geschnittenem pT7-4CB ist neben A noch eine weitere Bande B mit gleicher Intensität wie A, aber mit geringerer Mobilität zu sehen (Fig. 27, Spur 1). Da B nur an der geschnittenen Matrize auftritt, sollte es sich dabei - wie bereits in Kap. 1.1. beschrieben - um ein "Run off" Transkript handeln.

Da die Transkription an pT7-4CB bei Position 57 in Richtung kleinere Nummern (bis 0/2388) startet, die *EcoRI* Stelle bei Position 2386 liegt und die Insertion CB 742 bp lang ist, sollte das *EcoRI* "Run off" Transkript B eine Länge von 801 nt. ($742 + 59$) besitzen (Fig. 28). Die durch Termination entstehende Bande A wandert zwischen B (Fig. 27, Spur 1) und dem bereits diskutierten (vgl. Fig. 24A) 505 nt. langen *XmnI* "Run off" Transkript C an pT7-4T (Fig. 27, Spur 9). Nach Interpolation beträgt die Länge von A ca. 690 nt..

Bei Start der RNA-Synthese an Phi 10 (Position 57), Lage der *AccI* Stelle bei Position 29 (Vektor) und dem Beginn der Insertion bei Position 23566 (T7 Genom) bedeutet das eine Termination in der Region um Position 24225 ($23566 + 690 - 28$) auf dem T7 Genom (Fig. 28A).

In diesem Bereich des T7 Genoms (Position 24209) liegt auch die Terminationsstelle von TPhi (Dunn und Studier, 1983). Somit spricht alles dafür, daß die RNA A durch Termination am Ende der TPhi Sequenz entsteht.

Die vergleichbar hohe Intensität der Terminations-RNA A gegenüber der Bande des "Run off" Transkripts B ist ein erster Hinweis, daß die Termination am längeren T7 DNA-Fragment *Cla C/Hpa B* effizienter - aber nicht 90% wie bei Carter *et al.* (1981) angegeben - als am kürzeren synthetischen Fragment T ist.

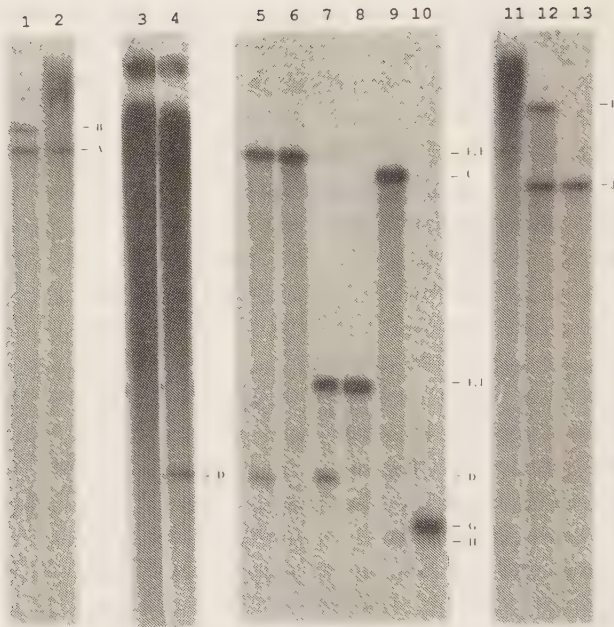


Fig. 27: *In vitro* RNA-Synthese an den Plasmiden pT7-4CB, pT7-4TPhiR, pT7-4TPhiL und pT7-4DA

Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte in einem 4%igen Polyacrylamid-Harnstoff-Gel. Alle auftretenden Banden sind im Text und in Fig. 28 beschrieben.

- | | |
|--|-----------------------------|
| 1: pT7-4CB/ <i>EcoRI</i> | 2: pT7-4CB |
| 3: pT7-4TPhiL | 4: pT7-4TPhiR |
| 5: pT7-4TPhiR/ <i>XmnI</i> | 6: pT7-4TPhiL/ <i>XmnI</i> |
| 7: pT7-4TPhiR/ <i>EcoRI</i> | 8: pT7-4TPhiL/ <i>EcoRI</i> |
| 9: pT7-4T/ <i>XmnI</i> | 10: pT7-4T/ <i>EcoRI</i> |
| 11: pT7-4DA | 12: pT7-4DA/ <i>EcoRI</i> |
| 13: pT7-4DA/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i> | |

Ein besser bestimmbarer Vergleich der Effizienz von T und TPhi ist dann möglich, wenn die an beiden Terminatoren entstehenden Transkripte eine in etwa gleiche Länge besitzen. So wurde das DNA-Fragment *Cla* C/*Hpa* B verkleinert, um die Entfernung der Terminationsstelle zum Promotor Phi 10 zu verringern. Das 126 bp lange Fragment *HinP* C aus *Cla* C/*Hpa* B (Fig. 9) erstreckt sich über einen Bereich von 24104 bis 24229 auf dem T7 Genom, enthält die Terminationsstelle von TPhi bei Position 24209 und den umliegenden Bereich (-106 bis +20). Durch Klonierung dieses Fragments in pT7-4 entstanden die rekombinanten Plasmide pT7-4TPhiR und pT7-4TPhiL (Fig. 9). Bei pT7-4TPhiR ist *HinP* C so in pT7-4 eingebaut, daß sich der Terminator TPhi und der Promotor Phi 10 in gleicher Orientierung zueinander (wie auf dem T7 Genom) befinden.

Bei pT7-4TPhiL dagegen liegt der Terminator auf dem komplementären DNA-Strang und in der zum Promotor falschen Orientierung (Fig. 9B).

Die *in vitro* Transkription an diesen beiden Plasmiden ohne Restriktionsschnitt ergab bei pT7-4TPhiL (Fig. 27, Spur 3) nur eine diffuse RNA-Spur. Zusätzlich war bei pT7-4TPhiR (Fig. 27, Spur 4) eine klare Bande D zu sehen, die durch spezifische Termination entstanden sein muß. Bei Kontrollen mit pT7-4TPhiR/*XmnI* (Spur 5) und pT7-4TPhiR/*EcoRI* (Spur 7) war neben D noch jeweils eine intensivere Bande E (Spur 5) und F (Spur 7) zu beobachten. Da E und F abhängig von der Art des Restriktionsschnitts auftraten, muß es sich bei ihnen um *XmnI* (E) bzw. *EcoRI* (F) "Run off" Transkripte handeln.

Die RNA-Synthese an Phi 10 (Position 57) startet in Richtung kleinerer Nummern und die Zählung des Vektors beginnt bei 0/2388. Da die Insertion *HinP* C 126 nt. lang ist, die *XmnI* Stelle sich bei 1988 und die *EcoRI* Stelle sich bei 2386 befindet, sollte das *XmnI* "Run off" Transkript E 583 nt. (457 + 126) und das *EcoRI* "Run off" Transkript F 185 nt. (59 + 126) lang sein (Fig. 28). RNA-Moleküle E' und F' mit gleicher Mobilität wie E und F waren bei Transkription an pT7-4TPhiL/*XmnI* (Spur 6) und an pT7-4TPhiL/*EcoRI* (Spur 8) zu beobachten. Dieser Befund ist zu erklären, denn die Plasmide pT7-4TPhiL und pT7-4TPhiR unterscheiden sich nur durch die Orientierung ihrer Insertion, die sich zwischen den Schnittstellen für *XmnI* bzw. *EcoRI* und dem T7 Promotor Phi 10 befindet (Fig. 28). Die an geschnittenem pT7-4TPhiL auftretenden Banden E' und F' (Fig. 27, Spuren 6 und 8) können somit als "Run off" Transkripte bestimmt werden.

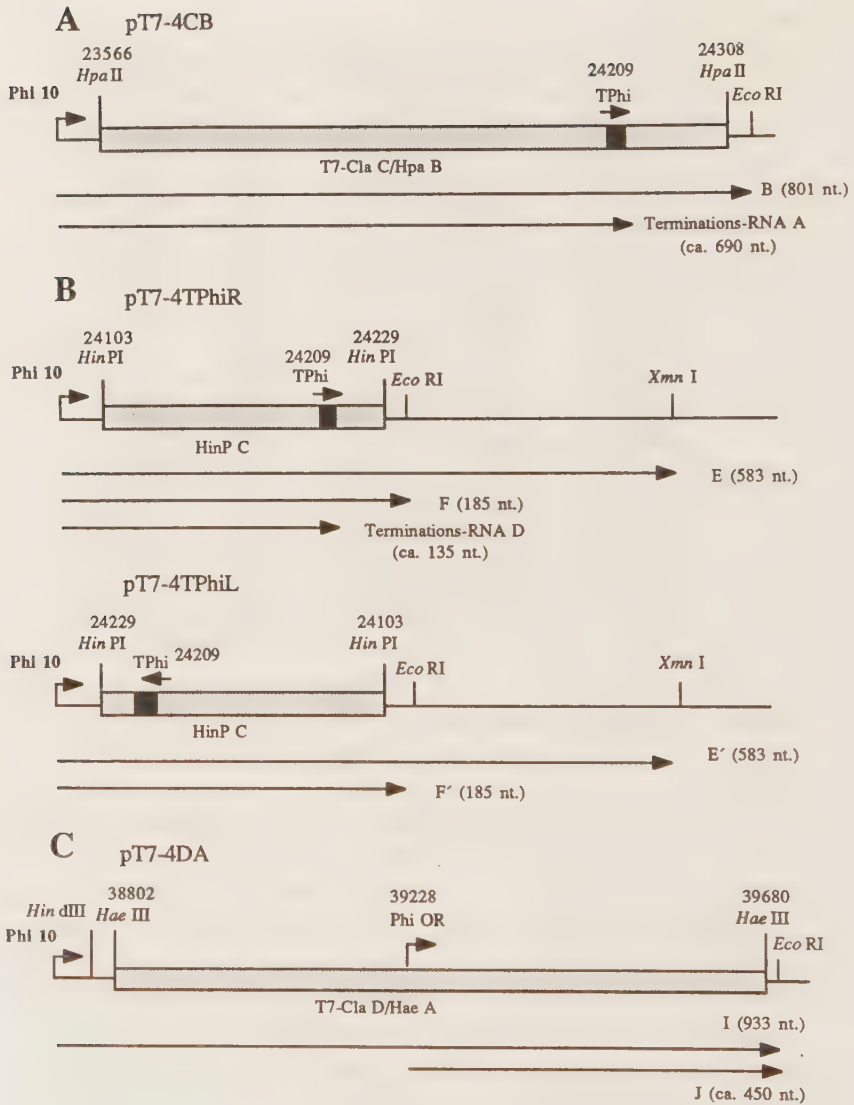


Fig. 28: Schematische Darstellung der Ergebnisse der *in vitro* RNA-Synthese an Insertionen aus T7 DNA

Legende von Fig. 28:

A) Termination an pT7-4CB

pT7-4CB entstand durch Insertion des 742 bp langen Fragments *Cla* C/*Hpa* B (Position 23566 bis 24308 von T7) in die *AccI* Stelle (Position 29) von pT7-4.

Das "Run off" Transkript B von Phi 10 (57) bis zur *EcoRI* Stelle (2386) ist 801 nt. (742 + 59) lang.

Durch Termination entsteht das Transkript A mit ca. 690 nt. Länge. Die Termination findet etwa bei Position 24225 auf dem T7 Genom - im Bereich der Terminationsstelle von TPhi (Position 24209) - statt.

B) Termination an pT7-4TPhiR und pT7-4PhiL

pT7-4TPhiR und pT7-4TPhiL entstanden durch Insertion eines 126 bp langen *HinPI/HinPI* Fragments (Position 24103 bis 24229 von T7) in die *AccI* Stelle von pT7-4.

Die "Run off" Transkripte von Phi 10 bis zur *XmnI* bzw. bis zur *EcoRI* Stelle (E, E' bzw. F, F') sind jeweils 583 nt. (126 + 457) bzw. 181 nt. (126 + 55) lang.

An pT7-4TPhiL mit TPhi in falscher Orientierung bezüglich Phi 10 wurde keine Termination beobachtet.

Durch Termination an pT7-4TPhiR entsteht ein Transkript D mit ca. 135 nt. Länge. Die Termination findet bei Position 24210 auf dem T7 Genom - genau an der Terminationsstelle von TPhi (Position 24209) - statt.

C) RNA-Synthese an pT7-4DA

pT7-4DA entstand durch Einbau des 878 bp langen Fragments *Cla* D/*Hae* A (Position 38802 bis 39680 von T7) in die *SmaI* Stelle von pT7-4.

Das "Run off" Transkript I von Phi 10 (57) bis zur *EcoRI* Stelle (2386) ist 937 nt. (878 + 59) lang. Ein "Run off" Transkript von Phi 10 bis zur *HindIII* Stelle (43) ist nur 14 nt. lang, da sich die Insertion hinter der Schnittstelle befindet.

Bei Schnitt von pT7-DA mit *EcoRI* und *HindIII* wurde ein ca. 450 nt. langes Transkript J gefunden. Dabei handelt es sich um ein "Run off" Transkript des T7 Promotors Phi OR (Position 39228 von T7).

Eine Termination wurde an pT7-4DA nicht beobachtet.

Es findet bei "falscher" Orientierung L von *HinP* C bezüglich des Promotors Phi 10 keine Termination statt, obwohl ein Transkript an pT7-4TPhiL eine thermodynamisch stabile RNA-Sekundärstruktur ausbilden kann (vgl. Fig. 58).

Die durch eine Termination an pT7-4TPhiR entstehende Bande D wandert zwischen der RNA F (185 nt.) und dem bereits diskutierten (vgl. Fig. 24) *EcoRI* "Run off" Transkript G an pT7-4T mit 107 nt. Länge (Fig. 27, Spur 10). Durch Interpolation wurde die Länge von D mit ca. 135 nt. bestimmt.

Bei Start der RNA-Synthese an Phi 10 (Position 57), Lage der *AccI* Stelle bei Position 29 (Vektor) und dem Beginn der Insertion *HinP C* bei Position 24103 (T7 Genom) bedeutet dies eine Termination in der Region um Position 24210 ($24103 + 135 - 28$) auf dem T7 Genom (Fig. 28). Dies stimmt auch sehr genau mit der Terminationsstelle von TPhi an Position 24209 (Dunn und Studier, 1983) überein. Bei D handelt es sich um ein durch Termination am Ende von TPhi entstandenes Transkript.

Die durch Termination an pT7-4TPHiR entstehende Bande D (Fig. 27, Spur 7) besitzt eine deutliche höhere Intensität als die Bande H, die durch Termination an pT7-4T entsteht (Fig. 27, Spur 10). Die Termination am 126 bp langen T7 Fragment *HinP C* ist offenbar wesentlich effizienter als am 58 bp langen synthetischen Fragment T.

Bei dieser Aussage muß man aber bedenken, daß ein Vergleich der Effizienz beider Terminatoren nach der gemessenen Bandenintensität nicht genau sein kann. So befinden sich auf der Terminations-RNA bei Fragment T 22 radioaktiv markierte U-Reste, während die Terminations-RNA bei Fragment *HinP C* 28 markierte U-Reste enthält. Deshalb besitzt ein durch Termination an *HinP C* entstehendes RNA-Molekül eine um den Faktor $14/11$ ($\approx 1,3$) höhere spezifische Radioaktivität als ein durch Termination an T entstehendes RNA-Molekül, was für den Vergleich der Effizienz beider Terminatoren berücksichtigt werden muß. Die quantitative Bestimmung der Effizienz aller gefundenen T7 Terminatoren erfolgt später im Kapitel 1.7..

Golomb und Chamberlin (1974) postulierten eine weitere Terminationsstelle bei *in vitro* Transkription mit der T7 RNA-Polymerase etwa in der Region von Nukleotid 39400 (98,5% des T7 Genoms).

Der Bereich mit dieser Terminationsstelle liegt auf dem 878 bp langen T7 DNA-Fragment *Cla D/Hae A*, das sich von Position 38802 bis 39680 auf dem T7 Genom erstreckt (Fig. 11) und in pT7-4 eingebaut wurde. Im rekombinanten Plasmid pT7-4DA (Fig. 11) befindet sich *Cla D/Hae A* in gleicher Orientierung bezüglich des T7 Promotors Phi 10 wie auf dem T7 Genom (Fig. 11).

Bei *in vitro* Transkription an ungeschnittenem pT7-4DA war nur eine diffuse RNA-Spur (Fig. 27, Spur 11) zu sehen. Ohne Restriktionsschnitt findet an pT7-4DA keine spezifische Termination der RNA-Synthese statt.

Bei *in vitro* Transkription an mit *EcoRI* linearisiertem pT7-4DA (Fig. 27, Spur 12) waren jedoch zwei intensive Banden I und J zu sehen. Die Bande I wandert etwas langsamer als die bereits diskutierte Bande B mit 801 nt. Länge (Fig. 27, Spur 1). Bei I sollte es sich daher um das "Run off" Transkript vom Promotor Phi 10 bis zur *EcoRI* Schnittstelle am Ende der Insertion handeln. Bei Start der RNA-Synthese an Phi 10 (Position 57) in Richtung kleinere Nummern (bis 0/2388), der Lage der *EcoRI* Stelle auf dem Vektor (Position 2386) und der Länge der Insertion DA (878 bp) muß I 937 nt. (59 + 878) lang sein (Fig. 28).

Die Bande J ist nach Interpolation ca. 450 nt. lang und könnte durch ein Terminationssignal entstehen, das nur an einer geschnittenen Matrize aktiv ist. Es könnte sich aber bei J auch um ein "Run off" Transkript eines weiteren T7 Promotors handeln, der sich auf *Cla D/Hae A* befindet.

Zur Überprüfung wurde deshalb eine Transkription mit pT7-4DA durchgeführt, das gleichzeitig mit *EcoRI* und *HindIII* geschnitten war. Die Schnittstelle für *HindIII* auf pT7-4DA (Position 43) liegt nur 14 nt. nach dem Start der Transkription an Phi 10 (Fig. 28), so daß bei diesem Experiment kein an Phi 10 beginnendes "Run off" Transkript sichtbar ist. Die Bande J wurde jedoch auch bei diesem Experiment beobachtet (Fig. 27, Spur 12) und kann somit nicht durch RNA-Synthese an Phi 10 entstehen. Es muß sich bei J also um ein "Run off" Transkript eines weiteren T7 Promotors auf *Cla D/Hae A* und nicht um ein Terminations-Transkript handeln.

Tatsächlich befindet sich an Position 39228 des T7 Genoms und somit auf *Cla D/Hae A* die Initiationsstelle der RNA-Synthese für den T7 Promotor der Klasse III PhiOR, der für die DNA-Replikation von T7 bedeutsam ist (Dunn und Studier, 1983).

Die Insertion *Cla D/Hae A* befindet sich in der *SmaI* Stelle von pT7-4 (Position 13), die 15 bp entfernt von der *EcoRI* Stelle (Position 2386) liegt. Durch Start der Transkription an PhiOR sollte somit an pT7-4DA/*EcoRI* und an pT7-4/*EcoRI* + *HindIII* eine "Run off" RNA von 467 nt. (39680 - 39228 + 15) Länge entstehen, deren Mobilität genau der Bande J entspricht.

Man muß aus diesem Befund schließen, daß im Bereich der Nukleotide 38802 bis 39680 am Ende des T7 Genoms bei einer *in vitro* Transkription keine Termination stattfindet.

1.3. Termination am *E. coli* *rmb* Operon

Das Bakterium *E. coli* besitzt 7 Operons für die Synthese von ribosomaler RNA (Kiss *et al.*, 1977). Diese Operons werden jeweils als 30S Vorläufer RNA transkribiert, durch Prozessierung mit RNase III werden anschließend die reifen rRNA Transkripte erzeugt (Ginsburg und Steitz, 1975). Eines der ribosomalen Operons ist *rmb*, dessen Aufbau und Nukleotidsequenz von Brosius *et al.* (1981) bestimmt wurde (Fig. 29). Das *rmb* Operon enthält Gene für die ribosomalen 16S, 23S und 5S RNA-Moleküle, sowie ein Gen für die tRNA^{Glu}₂. Die Initiation der RNA-Synthese bei *rmb* findet an den Tandem-Promotoren P1 und P2 statt. Am Ende des Operons befinden sich zwei Rho-unabhängige *E. coli* Terminatoren *rmb*-T1 und *rmb*-T2. Die Termination findet an *rmb*-T1 etwa bei Position 6660 von *rmb* direkt nach dem 3'-Terminus der 5S rRNA und an *rmb*-T2 etwa bei Position 6820 statt (Brosius *et al.*, 1981). Die Nukleotidsequenz der beiden *E. coli* Terminatoren ist nicht homolog zum T7 Terminator TPhi (Steen *et al.*, 1986).

Mein Ziel war es zu untersuchen, ob *rmb*-T1 und *rmb*-T2 von der T7 RNA-Polymerase erkannt werden. Das 718 bp lange *Hind*III/*Xmn*I DNA-Fragment R mit dem Abschnitt von 6416 bis 6840 aus dem *rmb* Operon wurde in pT7-4 eingebaut. Das rekombinante Plasmid wurde pT7-R bezeichnet (Fig. 12). Auf R befinden sich das Gen für die 5S rRNA und die beiden Terminatoren *rmb*-T1 und *rmb*-T2 (Fig. 14 und 29). Die Orientierung von R bezüglich des T7 Promotors Phi 10 auf pT7-R ist so wie auf dem Expressionsvektor pKK223-3 bezüglich des *E. coli* *tac* Promotors (Fig. 12) und auf dem *rmb* Operon bezüglich der Promotoren P1 und P2 (Fig. 29).

Bei *in vitro* Transkription mit T7 RNA-Polymerase an ungeschnittenem pT7-R sind die Banden A, B1, B2, C, D, E und F zu sehen (Fig. 30, Spur 1). Daneben ist noch eine größere Anzahl schneller wandernder und sehr wenig intensiver Banden zu erkennen, die nicht diskutiert werden. Die bei Transkription an anderen ungeschnittenen Matrizen auftretende diffuse RNA-Spur mit geringer Mobilität (vgl. Erg., 1.1.) besitzt bei pT7-R nur eine sehr geringe Intensität.

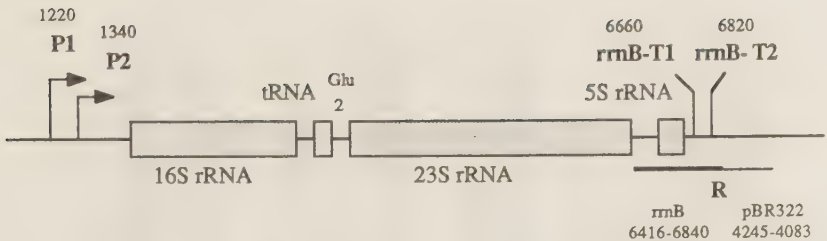


Fig. 29: Schematische Darstellung des *E. coli* *rrmB* Operons

Die Transkription auf dem *rrmB* Operons startet an den Tandem-Promotoren P1 (1220) und P2 (1340). Auf *rrmB* befinden sich die 16S (1518 bis 3059), 23S (3499 bis 6403) und 5S (6495 bis 6615) rRNA-Gene und das Gen für die tRNA^{Glu₂} (3231 bis 3306). Am Ende des Operons liegen zwei *E. coli* Terminatoren *rrmB*-T1 (6660) und *rrmB*-T2 (6820). Das Fragment R (isoliert aus pKK223-3) enthält den Bereich von 6416 bis 6840 aus *rrmB* mit dem 5S rRNA Gen und den Terminatoren *rrmB*-T1 und *rrmB*-T2, sowie aus pBR322 die Nukleotide 4245 - 4083 (siehe Fig. 12 und 14).

Alle erkennbaren Banden müssen durch eine spezifische Termination entstanden sein, da an einer ungeschnittenen Matriz e keine "Run off" Transkripte auftreten. Auf Grund ihrer hohen Intensität sollte die Bande C an der effizientesten der Terminationsstellen auf R entstehen. Ebenfalls recht intensiv ist die Doppelbande B1, B2, die an zwei sehr nahe beisammenliegenden Terminationsstellen entstehen sollte. Die Banden C, B1, B2 und D besitzen nur einen geringen Mobilitätsunterschied. Wenn die Synthese dieser Transkripte am T7 Promotor Phi 10 auf dem Vektor beginnt, müssen sie durch Termination innerhalb eines engen Abschnitts der Matriz e entstehen.

Bei A handelt es sich um eine einzelne Bande mit geringer Mobilität. Die Terminationsstelle von A sollte sich daher 3'-stromabwärts der Terminationsstellen für die anderen Banden befinden.

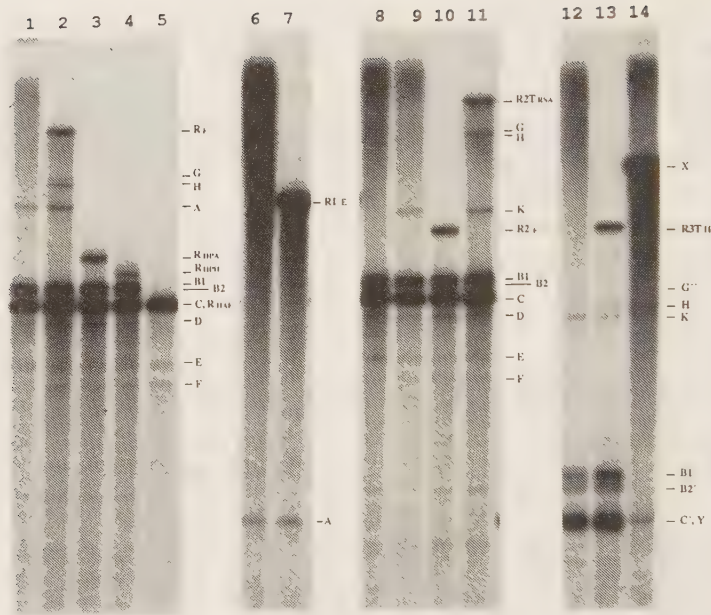


Fig. 30: *In vitro* RNA-Synthese an den Plasmiden pT7-R, pT7-R1, pT7-R2, pT7-R2T und pT7-R3T

Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte in einem 4%igen Polyacrylamid-Harnstoff-Gel. Alle auftretenden Banden sind im Text und in Fig. 31 beschrieben.

- | | |
|----------------------------|---------------------------|
| 1: pT7-R | 2: pT7-R/ <i>Eco</i> RI |
| 3: pT7-R/ <i>Hpa</i> II | 4: pT7-R/ <i>Hph</i> I |
| 5: pT7-R/ <i>Hae</i> III | 6: pT7-R1 |
| 7: pT7-R1/ <i>Eco</i> RI | 8: pT7-R2 |
| 9: pT7-R2T | 10: pT7-R2/ <i>Eco</i> RI |
| 11: pT7-R2T/ <i>Rsa</i> I | 12: pT7-R3T |
| 13: pT7-R3T/ <i>Hin</i> PI | 14: pT7-4T/ <i>Xmn</i> I |

Die wenig intensiven Banden E und F besitzen die größte Mobilität. Ihre Terminationsstellen sollten daher am nächsten zum Promotor Phi 10 gelegen sein.

Bei Transkription an mit *EcoRI* geschnittenem pT7-R (Fig. 30, Spur 2) sind A, B₂, C, D, E und F mit etwa gleicher relativer Intensität wie an der ungeschnittenen Matrize zu sehen. Bei B₁ hingegen ist eine deutliche Intensitätsverstärkung durch den Restriktionsschnitt zu beobachten. Weiterhin treten drei neue Banden R_E, G und H auf. Da diese Transkripte an einer ungeschnittenen Matrize nicht zu sehen sind, handelt es sich bei ihnen vermutlich um "Run off" Transkripte. Die RNA R_E besitzt die geringste Mobilität auf der Spur und sollte daher das - auch bei allen bisherigen Experimenten auftretende - "Run off" Transkript vom T7 Promotor Phi 10 bis zum Ende der Matrize an der Schnittstelle sein.

Auf pT7-R befindet sich die Insertion R (718 bp) zwischen der *HindIII* (Position 43) und der *SmaI* Stelle (Position 13). Da die RNA-Synthese an Position 57 (Phi 10) in Richtung kleinerer Nummern (bis 0/2388) startet und die *EcoRI* Schnittstelle an Position 2386 liegt, muß R_E 747 nt. (718 + 59 - 30) lang sein (Fig. 31A).

Die Banden G und H wandern zwischen R_E und A. Da sie nur bei Restriktionsschnitt auftreten, ist es unwahrscheinlich, daß sie durch Termination entstanden sind. Wenn es sich aber bei ihnen um "Run off" Transkripte handelt, kann ihre Synthese nicht am Promotor Phi 10 beginnen. Daher müssen sich zwei weitere T7 Promotoren auf dem Fragment R befinden, die mit Phi R1 und Phi R2 bezeichnet werden sollen. Wenn sich bei weiteren Experimenten das Vorhandensein dieser Promotoren bestätigt, so müßte ermittelt werden, ob alle an ungeschnittener Matrize beobachteten Terminations-Transkripte durch Initiation der RNA-Synthese an Phi 10 oder an Phi R1 und Phi R2 entstanden sind.

Die Klärung dieser Frage, sowie die Lokalisierung der Terminationstellen der Transkripte A, B₁, B₂, C, D, E und F auf pT7-R sollte mit Hilfe von Transkriptions-Experimenten an Matrizen geschehen, die mit Restriktionsenzymen innerhalb von R gespalten waren.

Bei Transkription an mit *HpaII* geschnittenem pT7-R (Fig. 30, Spur 3) waren von den bereits diskutierten Banden B₁, B₂, C, D, E und F zu sehen. Es fehlten R_E, A, G und H.

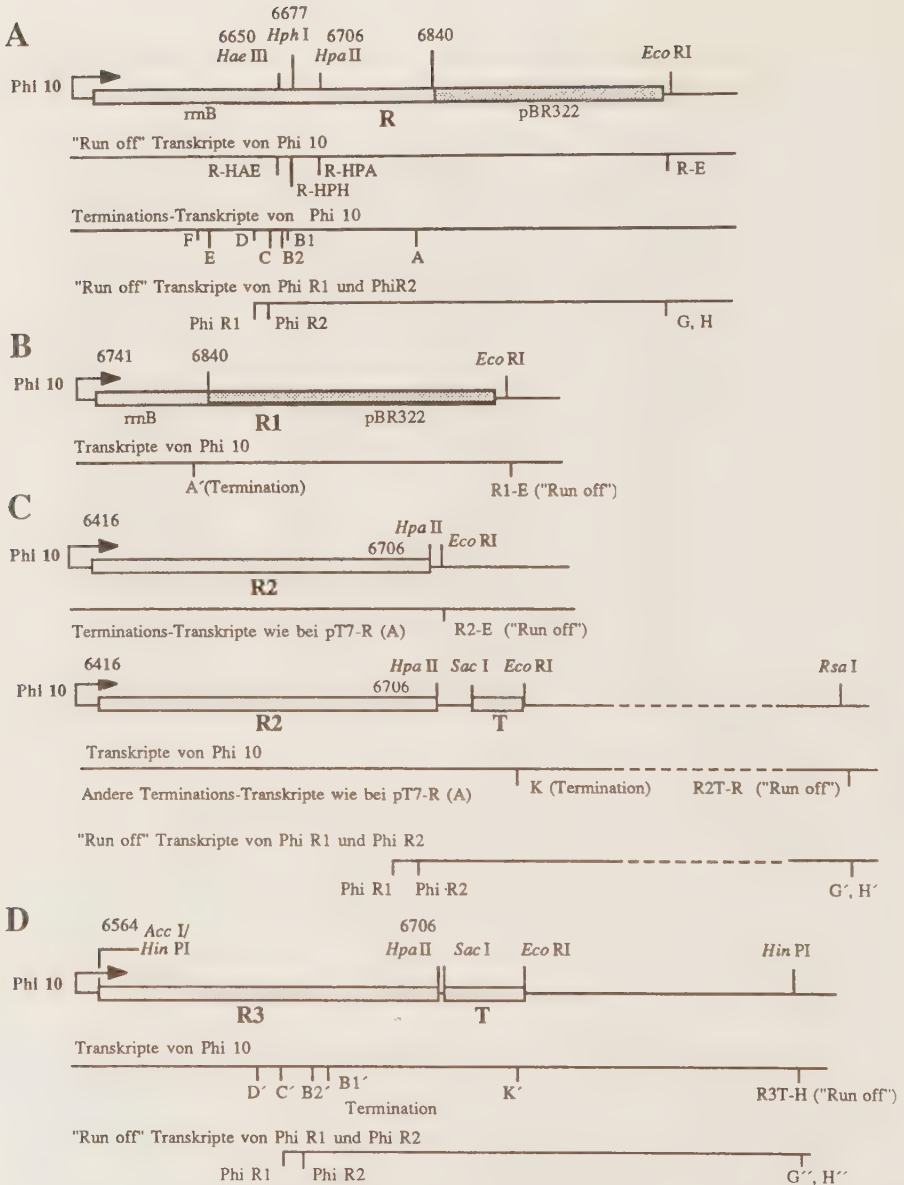


Fig. 31: Lokalisierung von Terminationsstellen und Promotoren auf dem Fragment R

Legende von Fig. 31:A) RNA-Synthese an pT7-R

pT7-R enthält die 718 bp lange Insertion R (Position 6418 bis 6840 des *rnmB* Operons und 282 bp aus pBR322). Eine Schnittstelle für *EcoRI* befindet sich an Position 2386 des Vektors. Schnittstellen für *HpaII*, *HphI* bzw. *HaeIII* befinden sich auf R (Position 6706, 6677 und 6650 von *rnmB*). "Run off" Transkripte bis zu diesen Schnittstellen sind 747 nt. (R_E), 304 nt. (R_{HFA}), 275 nt. (R_{HFI}) bzw. 248 nt. (R_{HAE}) lang. Durch Termination entstehen 7 Transkripte, deren Längen durch Interpolation bestimmt wurden: A 415 nt., B1 265 nt., B2 260 nt., C 245 nt., D 228 nt., E 191 nt. und F 179 nt.. Durch Initiation der RNA-Synthese an den T7 Promotoren Phi R1 und Phi R2 entstehen die *EcoRI* "Run off" Transkripte G (500 nt.) und H (485 nt.).

B) RNA-Synthese an pT7-R1

pT7-R1 enthält die 397 bp lange Insertion R1 (Position 6641 bis 6840 von *rnmB* und 282 bp aus pBR322). Das "Run off" Transkript $R1_E$ bis zur Schnittstelle für *EcoRI* (2386 auf dem Vektor) ist 425 nt. lang. Durch Termination entsteht das ca. 100 nt. lange Transkript A'.

C) RNA-Synthese an pT7-R2 und pT7-R2T

pT7-R2 und pT7-R2T enthalten die 296 bp lange Insertion R2 (Position 6418 bis 6706 von *rnmB*). Ein "Run off" Transkript $R2_E$ an pT7-R2 von Phi 10 bis zur *EcoRI* Stelle (2386 auf dem Vektor) ist 340 nt. lang. Ein "Run off" Transkript $R2T_{HSA}$ an pT7-R2T bis zur *RsaI* Stelle (1872 auf dem Vektor) ist 902 nt. lang. Es wurden die bereits oben (Fig. 31A) beschriebenen Terminations-RNAs B1, B2, C, D, E und F gefunden. An pT7-R2T tritt eine neue Terminations-RNA K mit ca. 385 nt. Länge auf. Durch Initiation der RNA-Synthese an den T7 Promotoren Phi R1 und Phi R2 entstehen die *RsaI* "Run off" Transkripte G' (655 nt.) und H' (640 nt.).

D) RNA-Synthese an pT7-R3T

pT7-R3T enthält die 229 bp lange Insertion R3 (Position 6564 bis 6706 von *rnmB*). Ein "Run off" Transkript $R3T_H$ von Phi 10 bis zur Schnittstelle für *HinPI* (2285 auf dem Vektor) ist 358 nt. lang. Durch Termination entstehen 4 Transkripte, deren Längen durch Interpolation bestimmt wurden: K' 231 nt., B1' 123 nt., B2' 117 nt. und C' 100 nt.. Durch Initiation der RNA-Synthese an den T7 Promotoren Phi R1 und Phi R2 entstehen die *EcoRI* "Run off" Transkripte G'' (260 nt.) und H'' (242 nt.).

Dafür trat eine neue Bande R_{BPA} auf, bei der es sich - analog zu R_E - um ein "Run off" Transkript handelt, das vom Promotor Phi 10 bis zur ersten Schnittstelle für *Hpa*II auf R (Position 6706 von *rmb*) reicht.

Die Insertion R beginnt in der *Hind*III Stelle des Vektors (43) und bei Position 6416 von *rmb*. Die Länge von R_{BPA} beträgt damit 304 nt. ($6706 - 6416 + 57 - 43$) (Fig. 31A).

Das Fehlen der Banden R_E , G und H ist nicht verwunderlich, da es sich bei ihnen um - von der Art des Restriktionsschnitts (hier: *Eco*RI) abhängig auftretende - "Run off" Transkripte handeln sollte. Daß bei diesem Experiment keine an Phi R1 und Phi R2 beginnenden "Run off" Banden zu sehen sind, ist vermutlich auf die zu geringe spezifische radioaktive Markierung solcher Transkripte - bedingt durch die Verkürzung der Matrize - zurückzuführen.

Die Verkürzung der Matrize durch Spaltung mit *Hpa*II bedingt auch das Fehlen der Terminations-RNA A, deren Terminationsstelle sich offenbar 3'-stromabwärts der *Hpa*II Schnittstelle (Position 6707 von *rmb*) befindet.

An mit *Hph*I geschnittenem pT7-R (Fig. 30, Spur 4) waren ebenfalls B1, B2, C, D, E und F zu sehen. Dabei verringert sich die relative Intensität von D deutlich gegenüber den anderen Banden. Bei der neu auftretenden Bande R_{BPH} sollte es sich dabei um das "Run off" Transkript vom Promotor Phi 10 bis zur ersten Schnittstelle für *Hph*I auf R (Position 6677 von *rmb*) handeln. R_{BPH} muß daher eine Länge von 275 nt. ($6677 - 6416 + 57 - 43$) besitzen (Fig. 31A).

An mit *Hae*III geschnittenem pT7-R (Fig. 30, Spur 5) sind von den bekannten Banden nur E und F, sowie eine intensive Bande R_{BAE} zu sehen, die auf der Höhe von C wandert. Da hier die längeren durch Termination an pT7-R entstehenden Banden A, B1 und B2 fehlen, sollte es sich daher bei R_{BAE} nicht um eine Terminations-RNA wie C, sondern um ein "Run off" Transkript handeln, das von Phi 10 bis zur ersten Schnittstelle für *Hae* III auf dem Fragment R (Position 6650 von *rmb*) reicht. Daher muß R_{BAE} 248 nt. ($6650 - 6416 + 57 - 14$) lang sein (Fig. 31A). Ein merkwürdiges Verhalten zeigt die Bande D, die - obwohl sie kürzer als R_{BAE} ist - bei Transkription an pT7-R/*Hph*I (Spur 4) schwächer wird und an pT7-R/*Hae*III (Spur 5) verschwindet. Offenbar wird D durch ein Terminationssignal erzeugt, das nur aktiv ist, wenn die nachfolgende Nukleotidsequenz auf der Matrize hinreichend lang ist.

Durch Interpolation aus der Wanderung der besprochenen "Run off" Transkripte wurde die Länge der durch Termination entstehenden Banden A, B1, B2, C, D, E und F und damit die genaue Lage ihrer Terminationsstellen auf *rmb* bestimmt. Danach sind die Transkripte A 415 nt., B1 265 nt., B2 260 nt., C 245 nt., D 228 nt., E 191 nt. und F 179 nt. lang. Die Terminationsstellen auf *rmb* liegen daher etwa für A bei Position 6815, für B1 bei 6662, für B2 bei 6657, für C bei 6642, für D bei 6625, für E bei 6590 und für F bei 6580.

Die Lage der Terminationsstelle von A entspricht genau der Region um 6820, in der sich der *E. coli* Terminator *rmb*-T2 befindet (Fig. 32A). Die Terminationsstelle der Doppelbande B1, B2 liegt am Ende des *E. coli* Terminators *rmb*-T1 bei 6660, die Terminationsstellen für C und D befinden sich innerhalb bzw. am Beginn der palindromen Nukleotidsequenz von *rmb*-T1 (Fig. 32B). Die Terminationsstellen für E und F müssen auf dem Gen für die 5S rRNA liegen (Fig. 32C).

Die Interpolation ergibt weiterhin für G ca. 500 nt. und für H ca. 485 nt.. Bei G und H (Fig. 30, Spur 2) handelt es sich vermutlich um *EcoRI* "Run off" Transkripte, die an zwei Promotoren Phi R1 und Phi R2 auf dem Fragment R starten. Zur Bestimmung der Initiationsstellen für die RNA-Synthese muß beachtet werden, daß am 3'-Ende der Insertion R (nach dem Ende des *rmb* Abschnitts bei 6840) sich 282 bp aus pBR322 befinden (vgl. Fig. 29) und hinter der Insertion R noch 15 bp zwischen der *SmaI* (13) und der *EcoRI* Stelle auf dem Vektor liegen. Daher muß die Initiation der RNA-Synthese an Phi R1 (für G) und Phi R2 (für H) etwa bei Position 6637 ($6840 - 500 + 282 + 15$) bzw. 6652 ($6840 - 485 + 282 + 15$) auf *rmb* stattfinden (Fig. 32D).

Die Lokalisierung von Terminationsstellen auf dem Fragment R gilt nur unter der Annahme, daß die Banden B1, B2, C, D, E und F durch Termination der RNA-Synthese am T7 Promotor Phi 10 und nicht an Phi R1 oder Phi R2 entstehen. Die RNA-Synthese an Phi R1 und Phi R2 beginnt etwa an Position 6637 bzw. 6652 auf *rmb*. An der mit *HpaII* gespaltenen Matrize muß jede Transkription an Position 6706 (der *HpaII* Schnittstelle) auf *rmb* enden. An pT7-R/*HpaII* können daher Transkripte, deren Synthese an Phi R1 oder Phi R2 beginnt, höchstens 69 bzw. 54 nt. lang sein. Da jedoch die Terminations-RNAs F bis B1 mit einer Länge von mindestens 180 nt. (bei F) auch an pT7-R/*HpaII* (Fig. 30, Spur 3)

zu beobachten sind, wird klar, daß diese Transkripte durch Synthese am Promotor Phi 10 und nicht an Phi R1 oder Phi R2 entstehen müssen.

Das Transkript A (Fig. 30, Spur 1, 2) muß durch Termination bei Position 6815 auf *rmb* (im Bereich des *E. coli* Terminators *rmb*-T2) entstehen. Auf dem Fragment R scheint sich hinter der Schnittstelle für *Hpa*II an Position 6706 nur diese eine Terminationsstelle zu befinden. Die RNA-Moleküle G und H, die nur an mit *Eco*RI geschnittenem pT7-R beobachtet wurden und etwas langsamer als A wandern, sollten dagegen - wie bereits diskutiert - "Run off" Transkripte der T7 Promotoren Phi R1 und Phi R2 auf *rmb* sein.

Zur Prüfung dieses Befunds wurde das 397 bp lange *Hpa*II/*Eco*RI Fragment R1 zwischen die *Acc*I und die *Eco*RI Stelle von pT7-4 eingebaut und dadurch das Plasmid pT7-R1 konstruiert (Fig. 14). R1 enthält den 3'-seitigen Teil von R mit dem Abschnitt von 6741 bis 6840 aus *rmb*, sowie einen 282 bp langen Bereich aus pBR322 (Fig. 14).

Bei Transkription an ungeschnittenem pT7-R1 (Fig. 30, Spur 6) ist neben einer intensiven diffusen RNA-Spur eine Bande A' zu sehen, die durch spezifische Termination entstehen sollte. Eine Bande, die wie A' wandert, ist auch bei einem Kontrollversuch an mit *Eco*RI geschnittenem pT7-R1 zu sehen (Fig. 30, Spur 7). Hier tritt noch - neben einigen sehr schwachen Banden - eine sehr intensive Bande R1_E auf, die knapp unterhalb des bereits diskutierten (vgl. Fig. 24) 505 nt. langen *Xmn*I "Run off" Transkripts X an pT7-4T (Fig. 30, Spur 14) wandert. Bei R1_E sollte es sich um ein "Run off" Transkript handeln, das vom Promotor Phi 10 bis zur Schnittstelle für *Eco*RI am Ende der Insertion R1 reicht und 425 nt. (397 + 28) lang ist (Fig. 31B). Da A' auf gleicher Höhe wie die genau 100 nt. lange (vgl. Kap. 1.5.) Terminations-RNA Y an pT7-4T (Fig. 30, Spur 14) wandert, muß auch A' 100 nt. lang sein.

Auf diese Weise kann die Terminationsstelle von A' lokalisiert werden. Sie befindet sich ca. an Position 6813 auf *rmb* (6741 + 100 - 28) bei *rmb*-T2, genau am Ort der Terminationsstelle von A (Fig. 32B). Die Transkription der T7 RNA-Polymerase terminiert auf dem Fragment R1 nur an *rmb*-T2.

Die hypothetischen Terminationsstellen der Banden G und H (Fig. 30, Spur 2) sollten auf Grund der Transkriptlänge etwa 80 bp 3'-stromabwärts der Terminationsstelle von A (bzw. A') liegen. Aber an pT7-R1 und

pT7-R1/*EcoRI* (Fig. 30, Spuren 6 und 7) sind keine Banden mit einer Länge von 180 nt. (auf Höhe von F) zu sehen. Damit ist endgültig klar, daß G und H nicht durch Termination entstanden sein können.

Durch 3'-seitige Verkürzung von R entsteht ein 296 bp langes DNA-Fragment R2, das den Abschnitt von Position 6416 bis 6706 auf *rrnB* mit *rrnB*-T1 und dem 5S rRNA Gen enthält. Dieses Fragment wurde in die Plasmide pT7-4 und pT7-4T eingebaut (Fig. 14). Auf diese Weise entstanden die Plasmide pT7-R2 und pT7-R2T. pT7-R2T enthält hinter *rrnB*-T1 noch den synthetischen Terminator T.

Bei *in vitro* Transkription an ungeschnittenem pT7-R2 (Fig. 30, Spur 8) und pT7-R2T (Fig. 30, Spur 9) sind auf dem Gel eine wenig intensive diffuse RNA-Spur und die bereits bekannten Terminations-RNAs B1, B2, C, D, E und F zu sehen.

Bei pT7-R2T (Spur 9) tritt noch zusätzlich eine schwache Bande K auf, deren Länge durch Interpolation mit ca. 385 nt. bestimmt wurde. Da K an einer ungeschnittenen Matrize zu sehen ist, muß es sich um eine Terminations-RNA handeln. Die Terminationsstelle von K befindet sich kurz vor der *EcoRI* Stelle am Ende von T (Fig. 31C), da ein *EcoRI* "Run off" Transkript an pT7-R2T 388 nt. ($296 + 107 - 15$) lang wäre. So beträgt auf pT7-4T die Entfernung vom Start der RNA-Synthese (Phi 10) bis zur *EcoRI* Stelle 107 bp, während die Insertion R2 296 bp und die Deletion zwischen *HindIII* und *AclI* Stelle 15 bp lang sind.

An mit *EcoRI* geschnittenem pT7 R2 (Fig. 12, Spur 10) findet man neben einer höheren Intensität der Bande B1 - eine neue Bande R2_E. Bei R2_E sollte es sich um das "Run off" Transkript vom Promotor Phi 10 bis zur Schnittstelle für *EcoRI* am Ende der Insertion R2 handeln. Die Länge von R2_E ist 340 nt. (Fig. 31C), da auf pT7-4 (ohne Insertion) die Entfernung vom Start der RNA-Synthese (Phi 10) bis zur *EcoRI* Stelle 59 bp beträgt, die Insertion R2 296 bp und die Deletion zwischen *HindIII* und *AclI* Stelle 15 bp lang ist.

Bei Transkription an mit *RsaI* geschnittenem pT7-R2T (Fig. 30, Spur 11) sind alle an der ungeschnittenen Matrize auftretenden Banden K, B1, B2, C, D, E und F zu erkennen, wobei auch hier B1 im Vergleich zur ungeschnittenen Matrize (Spur 10) eine höhere Intensität besitzt. Daneben sind drei Banden R2T_{REA}, G' und H' zu sehen, bei denen es sich um "Run off" Transkripte handeln sollte, da sie an der ungeschnittenen

Matrize fehlen (Fig. 30, Spur 9). Die Bande mit der geringsten Mobilität Bande R2T_{RSA} sollte das 902 nt. (388 + 514) lange "Run off" Transkript (Fig. 31) vom Promotor Phi 10 bis zur Schnittstelle für *RsaI* (Position 1872 auf dem Vektor - 514 bp hinter der *EcoRI* Stelle bei 2386) sein. Die Länge von G' und H' wurde durch Interpolation mit ca. 655 bzw. 640 nt. ermittelt. Somit konnten die Startstellen für die Synthese von G' und H' bestimmt werden. Dazu muß man beachten, daß auf der Matrize nach dem Ende der Insertion R2 (*rmb* Position 6706) noch 593 bp bis zur *RsaI* Stelle folgen. Die Transkripte G' und H' starten in der Region um 6634 (6706 - 655 + 593) bzw. 6649 (6706 - 640 + 593) auf *rmb*. Dies ist genau der Bereich, in dem die Promotoren Phi R1 und Phi R2 liegen, deren Existenz mit diesem Experiment bestätigt werden kann.

Im nächsten Experiment wurde eine Matrize verwendet, bei der das Fragment R2T noch weiter verkleinert wurde. Durch 5'-seitige Deletion von R2T wurden 151 bp (darunter 68 bp aus dem 5S rRNA Gen) bis Position 6563 auf *rmb* entfernt. Ein 229 bp langes *HinPI/EcoRI* Fragment R3T, das nur noch *rmb*-T1 und den synthetischen Terminator T enthält, wurde in pT7-4 kloniert und das rekombinante Plasmid mit pT7-R3T bezeichnet (Fig. 14).

Bei *in vitro* Transkription an ungeschnittenem pT7-R3T (Fig. 30, Spur 12) sind mehrere durch Termination entstandene Banden zu sehen. Da sich auf der Matrize *rmb*-T1 und T befinden, sollte die Termination an bereits bekannten Stellen stattfinden. Die unterschiedliche Mobilität der Banden gegenüber früheren Experimenten war durch die 5'-seitige Deletion der Matrize bedingt. Die Bezeichnung der Banden mit K', B1', B2' und C' (Fig. 30, Spur 12 und 13) erfolgte durch Vergleich ihrer Intensität und relativen Wanderung mit den entsprechend bezeichneten Transkripten an pT7-R bzw. pT7-R2T (Fig. 30, Spuren 1 und 9). Durch Interpolation wurde gefunden, daß K' ca. 231 nt., B1' 123 nt., B2' 117 nt. und C' 100 nt. lang sind. Die Terminationsstellen auf *rmb* befinden sich für C' bei 6635 (C bei 6642), für B1' und B2' bei 6658 und 6652 (B1 bei 6660 und B2 bei 6655). In Klammern sind die an pT7-R gefundenen Terminationsstellen angegeben. Die Abweichung der Terminationsstellen auf pT7-R und pT7-R3T betrug dabei maximal 7 Nukleotide.

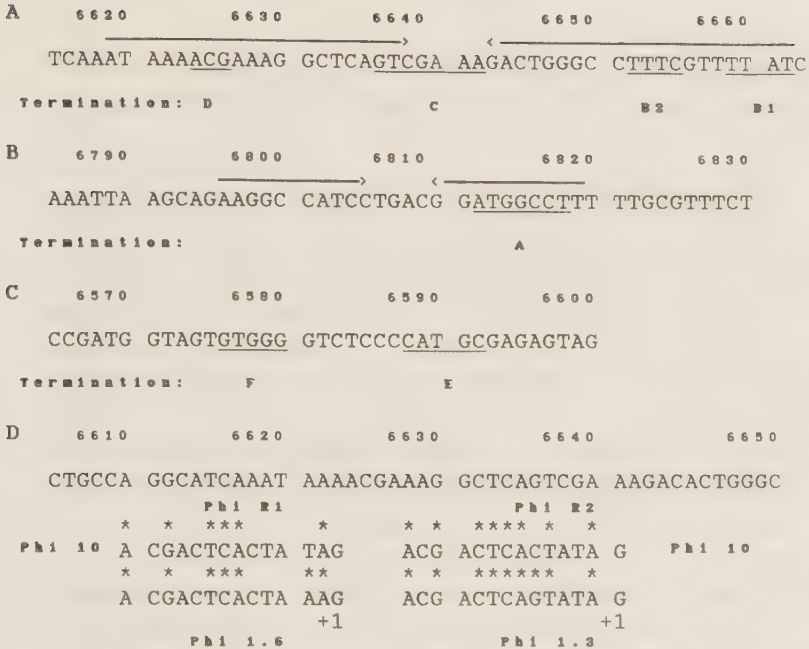


Fig. 32: Basenfolge der Terminationsstellen und Promotoren auf dem *E. coli* *rnaB* Operon

A) Terminator *rnbB-T1*

Die Terminationsstellen der T7 Transkripte befinden sich bei 6625 (D) am Anfang, 6635 bis 6642 (C) in der Mitte und 6652 bis 6655 (B1) bzw. 6658 bis 6660 (B2) am Ende des Palindroms (Pfeile). Auch bei 5'-seitiger Verkürzung der Matrize (pT7-R3T) wird Termination an den Stellen C, B1 und B2 - im Text und Fig. 31D bezeichnet mit C', B1' und B2' - gefunden.

B) Terminator *rrnB*-T2

Die T7 Terminationsstelle liegt bei 6813 bis 6815 (A) gegen Ende des Palindroms (Pfeile). Auch bei 5'-seitiger Verkürzung der Matrize (pT7-R1) wird Termination an A - im Text und Fig. 31B bezeichnet mit A' - gefunden.

C) Termination auf dem 5S rRNA-Gen

Die Termination auf dem 5S rRNA Ger. findet etwa an Position 6590 (E) und 6578 (F) statt.

D) Promotoren Phi R1 und Phi R2

Die RNA-Synthese startet an Phi R1 um 6623 und an Phi R2 um 6641. Die Homologie diese Sequenzabschnitte zu den T7 Promotoren Phi 1.3, Phi 1.6 und Phi 10 (Dunn und Studier, 1983) ist gekennzeichnet (*).

Die Länge der Bande K' entspricht einer Termination im Bereich des synthetischen Terminators T (Fig. 31).

Abschließend wurde eine Transkription an mit *Hin*PI geschnittenem pT7-R3T (Fig. 12, Spur 13) durchgeführt. Hier waren ebenfalls die Banden K' (sehr schwach), B1', B2' und C' zu sehen. Die Intensität der Bande B1' wurde durch den Restriktionsschnitt der Matrize erhöht. Dies war bereits bei der Bande B1 an pT7-R (Fig. 30, Spur 2) zu beobachten. Bei Schnitt mit *Hin*PI traten drei neue Banden R3T_B, G'' und H'' auf, die nicht durch Termination entstanden sein können, da sie an der ungeschnittenen Matrize fehlen. Bei der Bande R3T_B mit der geringsten Mobilität sollte es sich um das "Run off" Transkript von Phi 10 bis zur Schnittstelle für *Hin*PI (Position 2285 des Vektors) handeln. R3T_B ist demnach 358 nt. (229 - 31 + 160) lang (Fig. 31D), da die Länge der Insertion R3T 229 bp, die Deletion zwischen *Acc*I (Position 29) und *Eco*RI Stelle (Position 2386) 30 bp und die Entfernung der *Hin*PI Stelle vom Promotor Phi 10 (57) 160 bp beträgt.

Die Länge der nur sehr wenig intensiven "Run off" Transkripte G'' und H'' wurde mit ca. 260 bzw. 242 nt. ermittelt. Für die Bestimmung der Startstellen mußte berücksichtigt werden, daß sich zwischen dem Ende von R3 (*Acc*I Stelle bei 6706 von *rmb*) und der *Hin*PI Stelle auf dem Vektor noch 180 bp lagen. Die Transkripte G' und H' starten daher in der Region um 6626 (6706 - 260 + 180) bzw. 6644 (6706 - 242 + 180) auf *rmb*. Genau in diesem Bereich befinden sich die bereits beschriebenen T7 Promotoren Phi R1 und Phi R2, deren Existenz und Lage auch bei einem dritten Experiment bestätigt werden konnte.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die beiden *E. coli* Terminatoren *rmb*-T1 und *rmb*-T2 von der T7 RNA-Polymerase erkannt werden. Die Termination an *rmb*-T2 findet mit geringer Effizienz ca. bei Position 6815 von *rmb* gegen Ende des palindromen Sequenzbereichs statt (Fig. 32B).

Im Bereich von *rmb*-T1 liegen 4 Stellen, an denen - zusammengekommen - die RNA-Synthese fast vollständig terminiert wird. Zwei direkt benachbarte Terminationsstellen B1 und B2 befinden sich am Ende der palindromen Sequenz von *rmb*-T1. Eine sehr starke Terminationsstelle C befindet sich innerhalb des Palindroms, während sich noch eine schwächere Stelle D an seinem Beginn liegt (Fig. 32A).

Eine sehr geringe Termination der Transkription findet auch auf dem 5S rRNA Gen statt, sie erfolgt vor allem an zwei Stellen E und F ca. an Position 6590 bzw. 6578 auf *rnmB*. Zwischen diesen Positionen befindet sich ein palindromer Bereich auf der Matrize, allerdings ohne nachfolgende T-Reste, an dessen Anfang und Ende die beobachtete Termination stattfinden könnte (Fig. 32C).

Auf dem Fragment R befinden sich auch zwei Promotoren für die T7 RNA-Polymerase Phi R1 und Phi R2. Die an diesen Promotoren entstehenden Transkripte weisen nur eine sehr geringe Intensität auf (vgl. Fig. 30, Spuren 2, 11 und 13). Phi R1 und Phi R2 sind daher vermutlich nur schwache T7 Promotoren.

Vergleicht man die DNA-Sequenz des *rnmB* Operons von Position 6628 bis 6640 mit der Konsensussequenz eines T7 Promotors (Klasse III) von -13 bis -1 zur Startstelle der RNA-Synthese (Dunn und Studier, 1983), findet man eine Homologie von 62%. Die Homologie dieses Bereichs zum T7 Promotor Phi 1.3 (Dunn und Studier, 1983) beträgt sogar 69% (Fig. 32D). Nach dieser Homologie würde die Transkription an Phi R2 dann bei Position 6641 von *rnmB* (nahe bei der experimentell gefundenen Startstelle zwischen 6644 und 6650) mit der Basenfolge pppApApG beginnen.

Die DNA-Sequenz des *rnmB* Operons von Position 6810 bis 6821 besitzt ebenfalls eine Homologie von 46% zur Konsensussequenz eines T7 Promotors (Klasse III) von -13 bis -1 bezüglich zur Initiationsstelle der RNA-Synthese und von 54% zum T7 Promotor Phi 1.6 (Dunn und Studier, 1983). Die Transkription an Phi R1 sollte demnach bei Position 6622 von *rnmB* (nahe bei der experimentell gefundenen Startstelle zwischen 6626 und 6635) mit der Basenfolge pppApApC starten (Fig. 32D).

1.4. Termination am *E. coli* Rifampicin-Resistenzgen 3d^{rif}

Das Antibiotikum Rifampicin hemmt durch Anlagerung an die β -Untereinheit in der *E. coli* RNA-Polymerase die Synthese von langkettigen Transkripten (Hartmann *et al.*, 1985). Von Tropschug (1981) wurde ein Rifampicin-resistenter *E. coli* Stamm isoliert, dessen RNA-Polymerase aber gegenüber Rifampicin sensitiv ist. Ein 2145 bp langes DNA-Fragment 3d^{rif} aus dieser Mutante in einem Plasmid kann diese Rifampicin-Resistenz auf andere sensitive *E. coli* Stämme übertragen.

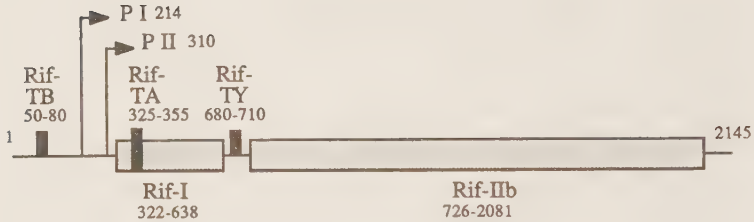


Fig. 33: Schematische Darstellung des *E. coli* 3d^{rif} Gens

Auf dem 2145 bp langen Rifampicin-Resistenzgen 3d^{rif} befinden sich offene Leserahmen für zwei Proteine mit einer Molekularmasse von 11,4k (Rif-I) und 48,5k (Rif-IIb).

Außerdem befinden sich auf 3d^{rif} zwei Bereiche Rif-TB und Rif-TY mit starker Ähnlichkeit zu *E. coli* Terminatoren (Heinrich, 1987). Eine Termination der T7 Transkription *in vitro* wurde an Rif-TB und einem weiteren Bereich Rif-TA gefunden.

Das 3d^{rif} Fragment wurde von Heinrich (1987) charakterisiert und sequenziert. Es enthält zwei offene Leserahmen, die für Proteine mit 11,4k und 48,5k Molekularmasse kodieren (Fig. 33). Auch zwei Strukturen mit starker Ähnlichkeit zu *E. coli* Terminatoren befinden sich auf dem 3d^{rif} Gen (Heinrich, 1987). Bisher wurde jedoch noch nicht untersucht, ob diese hypothetischen Terminatoren Rif-TB und Rif-TY wirklich von der *E. coli* RNA-Polymerase erkannt werden. Rif-TB und Rif-TY liegen in der Region um Position 80 bzw. 710 auf dem 3d^{rif} Gen (Fig. 33), wo sich palindrome Bereiche auf der DNA gefolgt von T-Resten befinden.

Mein Ziel war es, herauszufinden, ob an Rif-TB und Rif-TY oder an anderen Stellen auf dem 3d^{rif} Gen eine Termination mit der T7 RNA-Polymerase stattfindet. Als Matrize für dieses Experiment wurde das Plasmid pRif-4 verwendet, auf dem sich das 3d^{rif} Gen in einer Orientierung befindet, welche die Expression der Proteine Rif-I und Rif-IIb auf einer am T7 Promotor Phi 10 synthetisierten mRNA ermöglicht (Fig. 15).

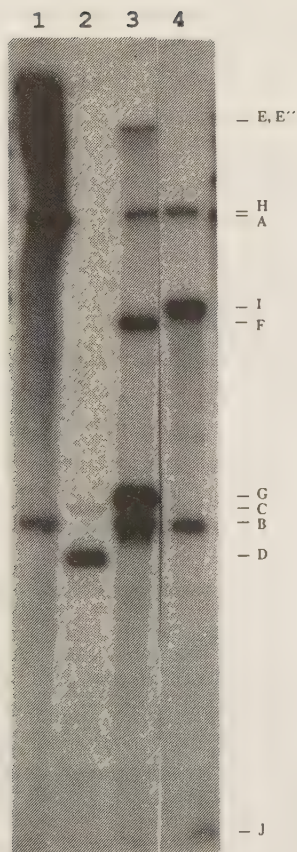


Fig. 34: *In vitro* RNA-Synthese an pRif-4

Die Auftrennung der Transkripte erfolgte in einem 4%igen Polyacrylamid-Harnstoff-Gel. Alle Banden sind im Text oder in Fig. 35 beschrieben.

- 1: pRif-4
- 2: pRif-4/*Hae*III (partiell)
- 3: pRif-4/*Dde*I (partiell)
- 4: pRif-4/*Acc*I (partiell)

Bei *in vitro* Transkription an ungeschnittenem pRif-4 mit T7 RNA-Polymerase (Fig. 34, Spur 1) ist die diffuse RNA-Spur zu sehen, die typisch für eine Transkription an ungeschnittener Matrize ist (vgl. Erg., 1.1.). Daneben treten zwei intensive Banden A und B auf, bei denen es sich um RNA-Moleküle mit definiertem 5'- und 3'-Ende handelt. Sie sollten durch Termination auf dem 3d^{r1f} Fragment entstanden sein, da an ungeschnittener Matrize keine "Run off" Transkripte auftreten.

Die Lokalisierung der Terminationsstellen von A und B sollte durch Transkription an geschnittenem pRif-4 geschehen. Dabei sollte die Spaltung nicht vollständig, sondern limitierend erfolgen. Auf jeder Spur sollte dann eine Leiter von unterschiedlichen "Run off" Transkripten bekannter Länge auftreten, so daß eine Interpolation zur Längenbestimmung von A und B möglich ist.

Bei Transkription an mit *Hae*III partiell gespaltenem pRif-4 (Fig. 34, Spur 2) sind zwei Banden C und D zu sehen, die anders als A oder B wandern. Die intensive Bande D wandert dabei etwas schneller als die Terminations-RNA B. Die kaum erkennbare Bande C wandert knapp oberhalb von B. Da C und D nicht an einer ungeschnittenen Matrize auftreten, muß es sich bei ihnen um "Run off" Transkripte handeln.

Das Enzym *Hae*III besitzt 9 Schnittstellen auf dem 3d^{r1f} Gen (Heinrich, 1987), wobei die ersten beiden sich an Position 59 und 81 befinden. Bei einer am Promotor Phi 10 beginnenden RNA-Synthese bis zu diesen beiden Schnittstellen, entstehen 96 bzw. 118 nt. lange "Run off" Transkripte (Fig. 35A) bedingt durch den 37 bp großen Abstand vom T7 Promotor Phi 10 bis zum Beginn der 3d^{r1f} Insertion. Die geringe Intensität der Bande C - einem "Run off" Transkript bis zur zweiten Schnittstelle von *Hae*III an Position 81 - ist vermutlich auf eine fast vollständige Spaltung der Matrize zurückzuführen. Die Transkription endet überwiegend bereits an der ersten Schnittstelle für *Hae*III auf dem 3d^{r1f} Gen bei Position 59. Daher sind die Banden A und B und die an vom Promotor weiter entfernt liegenden Schnittstellen endenden "Run off" Transkripte nicht zu sehen.

Die Terminations-RNA B wandert nur knapp unterhalb von C (118 nt.) und ist nach Interpolation 115 nt. lang. Zur Länge der Terminations-RNA A lassen sich aus diesem Experiment noch keine Schlüsse ziehen.

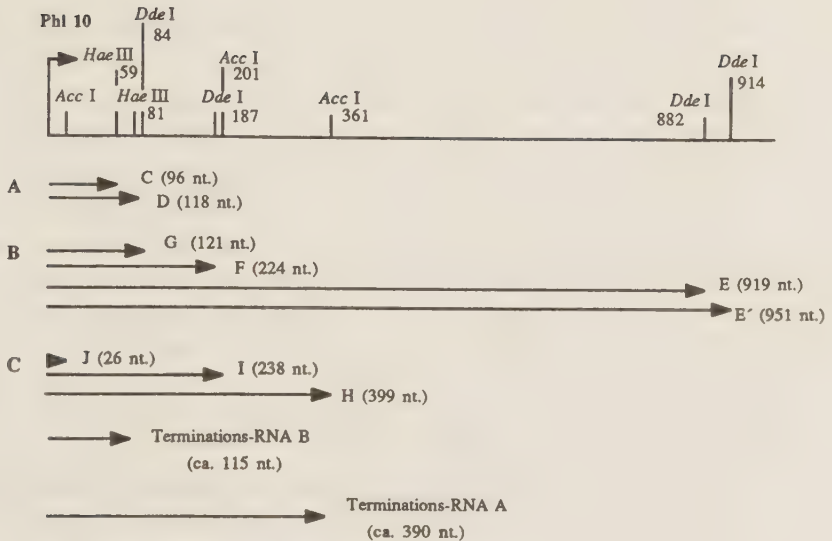


Fig. 35: Lokalisierung der Terminationsstellen auf 3d^{rif}

Die Transkription mit T7 RNA-Polymerase startet an Phi 10.

A) Schnittstellen für *Hae*III befinden sich an Position 59, 81, 490, 851, 1130, 1191, 1430, 1604 und 1659 auf 3d^{rif}. Nur die Stellen bei 59 und 81 sind in der Figur eingezeichnet.

Die "Run off" Transkripte an mit *Hae*III partiell gespaltenem pRif-4 bis zu den ersten beiden Schnittstellen sind 96 nt. (D) bzw. 118 nt. (C) lang.

B) Schnittstellen für *Dde*I befinden sich an Position 84, 187, 882 und 914. Die "Run off" Transkripte an mit *Dde*I partiell gespaltenem pRif-4 sind 121 nt. (G), 224 nt. (F), 919 nt. (E) und 951 nt. (E') lang.

C) Schnittstellen für *Acc*I befinden sich an Position 201 und 362 auf 3d^{rif}, sowie im Vektor (Position 31). Die "Run off" Transkripte an mit *Acc*I partiell gespaltenem pRif-4 sind 26 nt. (J), 238 nt. (I) und 399 nt. (H) lang.

Durch Termination entstehen die Transkripte A und B:

B ist ca. 115 nt. lang, das entspricht einer Termination ca. bei Position 78 auf 3d^{rif}.

A ist ca. 380 nt. lang, das entspricht einer Termination ca. bei Position 350 auf 3d^{rif}.

Bei Transkription an partiell mit *DdeI* gespaltenem pRif-4 (Fig. 34, Spur 3) waren 5 Banden zu sehen. Davon wanderten zwei genau wie A und B. Bei den drei anderen Banden E, F und G sollte es sich um *DdeI* "Run off" Transkripte handeln, da sie abhängig von der Art des Restriktionschnitts auftreten. Das Enzym *DdeI* besitzt 4 Schnittstellen auf 3d^{rif}, an Position 84, 187, 882 und 914 (Heinrich, 1987). Unter Berücksichtigung der Vektorsequenzen (37 bp) sollten bei Transkription an pRif-4/*DdeI* "Run off" Transkripte mit 121 (G), 224 (F), 919 (E) und 951 nt. (E') Länge entstehen (Fig. 35B). Dabei ist die Mobilitätsdifferenz zwischen den beiden längsten Transkripten zu gering, um sie noch auf dem Gel unterscheiden zu können. Die durch Termination entstandene Bande B wandert knapp unterhalb von G mit 121 nt. Länge. Somit kann die bereits erfolgte Längenbestimmung von B mit ca. 115 nt. bestätigt werden. Die Terminations-RNA A wandert zwischen den Banden F mit 224 nt. und E/E' mit 919/951 nt. Länge.

Eine Transkription an partiell mit *AccI* gespaltenem pRif-4 (Fig. 34, Spur 4) ergab 5 Banden. Zwei dieser Banden wandern wie die Terminations-RNAs A und B. Die drei anderen Banden H, I und J sind "Run off" Transkripte, da sie auf keiner der anderen Spuren auftreten. Die Bande H wandert nur so wenig oberhalb von A, so daß beide auf dem Autoradiogramm (Fig. 34) als Doppelbande erscheinen.

Das Enzym *AccI* besitzt zwei Schnittstellen auf 3d^{rif}, an Position 201 und 362 (Heinrich, 1987). An diesen Schnittstellen sind unter Berücksichtigung der Vektorsequenzen (37 bp) "Run off" Transkripte mit 238 (I) und 399 nt. Länge (H) zu erwarten (Fig. 35). Eine weitere Schnittstelle für *AccI* auf pRif-4 liegt innerhalb des Polylinkers zwischen dem Promotor Phi 10 und der Insertion. An dieser Schnittstelle entsteht ein 26 nt. langes Transkript, bei dem es sich um J handeln muß (Fig. 34). Nach Interpolation kann die Länge der Terminations-RNA A mit ca. 390 nt. bestimmt werden.

Somit können die T7 Terminationsstellen auf dem 3d^{rif} Gen lokalisiert werden. Die RNA B ist ca. 115 nt. lang (Fig. 35). Das entspricht einer Termination auf dem 3d^{rif} Gen bei Position 78. In diesem Bereich liegt genau die oligo(dT) Sequenz des potentiellen *E. coli* Terminators Rif-TB (Fig. 36A). Somit wird offenbar Rif-TB *in vitro* von der T7 RNA-Polymerase erkannt.

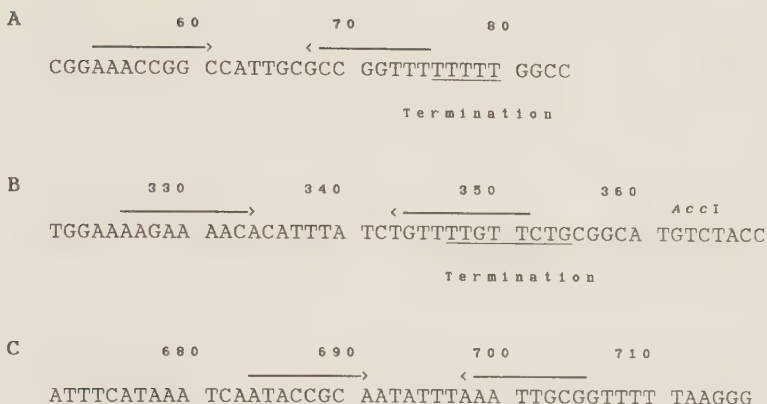


Fig. 36: Basenfolge im Bereich der Terminationsstellen auf dem 3d^{rif} Gen

A) Terminator Rif-TB

Rif-TB besteht aus einer GC-reichen palindromen DNA-Sequenz (Pfeile) gefolgt von 8 T-Resten. Die Termination findet gegen Ende des Palindroms statt ca. an Position 78 auf dem 3d^{rif} Gen (unterstrichen).

B) Terminator Rif-TA

Rif-TA befindet sich 10 Nukleotide vor der Schnittstelle für *AccI* (GTCTAC) ca. an Position 350 auf 3d^{rif} (unterstrichen). In dieser Region befindet sich ein Palindrom (Pfeile). Dort kann ein Transkript jedoch keine stabile RNA-Sekundärstruktur ausbilden. Der AT-Gehalt der DNA zwischen den Nukleotiden 324 und 353 auf 3d^{rif} ist mit 77% sehr hoch.

C) Hypothetischer Terminator Rif-TY

Rif-TY besteht aus einer GC-reichen palindromen DNA-Sequenz (Pfeile) gefolgt von 5 T-Resten.

Es wurde keine Termination gefunden.

Das Transkript A sollte ca. 390 nt. lang sein, das entspricht einer Termination etwa an Position 350 auf dem 3d^{rif} Gen – kurz nach dem Beginn (322) des für das Protein Rif-I kodierenden Gens (Fig. 33). Dort befindet sich ein Palindrom (Fig. 36A). Ein Transkript kann hier jedoch keine klassische stabile Sekundärstruktur ausbilden, da die potentielle Haarnadel nur ein energetisch günstiges G-C Hybrid-Basenpaar und außerdem noch einen Mismatch (G-G) enthält.

Das T7 Terminationssignal TA weist daher keine direkte Verwandtschaft mit einem klassischen *E. coli* Terminator auf.

Außer A und B waren keine weiteren durch Termination an pRif-4 entstandenen RNA-Moleküle zu beobachten. Daraus kann man schließen, daß der einem *E. coli* Terminator ähnliche Bereich TY bei Position 710 auf dem 3d^{rif} Gen (Fig. 33 und 36B) die *in vitro* Transkription durch T7 RNA-Polymerase nicht terminieren kann.

1.5. Bestimmung der Terminationsstellen an den Fragmenten T, S1 und S2 durch Transkriptsequenzierung

Bei Transkription an T7 Vektoren mit den synthetischen DNA-Fragmenten T, S1 und S2 wurde Termination der RNA-Synthese gefunden (vgl. Erg., 1.1.) Jedoch konnte die genaue Lage der Termination auf diesen Fragmenten nicht lokalisiert werden, da die Genauigkeit der Auflösung bei der elektrophoretischen Trennung zu gering war. Deshalb sollten die Nukleotide, an denen Termination stattfindet, durch eine direkte Transkriptsequenzierung bestimmt werden.

Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten, die Nukleotidsequenz von RNA-Molekülen zu bestimmen. Zunächst wurde eine Methode der Sequenzierung von RNA durch basenspezifische Spaltung entwickelt (Donis-Keller, et al., 1977). Diese Methode entspricht der DNA-Sequenzierung nach Maxam und Gilbert (1977), nur daß die Spaltung an Stelle von Chemikalien durch nukleotid-spezifische RNasen geschieht. Eine neuere Methode von Axelrod und Kramer (1985) ist ein Kettenabbruchverfahren analog der DNA-Sequenzierung nach Sanger *et al.* (1977). Die Rolle von Kettenabbruchmolekülen können 3'-Desoxyribonukleosid-Triphosphate (3'-dNTPs) übernehmen, die bei einer Transkriptionsreaktion von RNA-Polymerasen als Substratanaloga der Ribonukleosid-Triphosphate akzeptiert werden (Kramer und Mills, 1978 ; Axelrod *et al.*, 1978). Die RNA-Sequenzierung erfolgt so, daß zu einer *in vitro* Transkriptionsreaktion mit T7 oder SP6 RNA-Polymerase in 4 parallel durchgeführten Ansätzen jeweils ein 3'-dNTP zum Reaktionsgemisch gegeben wird. Das führt zur Termination der RNA-Synthese an einem bestimmten Nukleotid bei Einbau des entsprechenden Substratanalogons. Bei gleichzeitig durchgeführter Elektrophorese dieser 4 Ansätze (A, G, C und U) entsteht eine Bandenleiter wie auf einem DNA-Sequenzgel. So ist es möglich, die Nukleotidsequenz eines Transkripts direkt abzulesen.

Führt man parallel zu den Ansätzen A, G, C und U noch eine Standard-Reaktion ohne 3'-dNTP durch und verwendet man dabei eine Matrize, an der Termination stattfindet, so sollte es möglich sein, mit Hilfe der Sequenzleiter die Terminationsstelle zu bestimmen (vgl. Meth., 8.2.).

Eine solche Reaktion zur Transkriptsequenzierung wurde an mit *XmnI* geschnittenem pT7-4T durchgeführt (Fig. 37A). Es ist bereits bekannt, daß bei Transkription an dieser Matrize ein 505 nt. langes "Run off" Transkript und eine ca. 100 nt. lange Terminations-RNA entstehen (vgl. Erg., 1.1.). Wegen seiner geringen Mobilität ist das "Run off" Transkript in Fig. 37 nicht zu sehen.

Auf Spur N (ohne 3'-dNTP) sind insgesamt 5 Banden zu sehen (Fig. 37A). Davon wandern die beiden intensivsten Banden direkt übereinander. Die Bande des schnelleren dieser beiden Transkripte B ist dabei wesentlich intensiver als die des langsameren Transkripts D. Daneben sind noch drei schwächere Banden E, F und H mit höherer Mobilität zu sehen. Auf den Spuren A, G, C und U ist eine gut aufgelöste RNA-Sequenzleiter zu erkennen, die eine Bestimmung der Terminationspunkte auf dem Fragment T erlaubt. Wie aus Fig. 37A ersichtlich ist, wandert die intensivste Bande B auf Spur N oberhalb einer Folge von U-Resten, denen sich nach unten 4 G-Reste anschließen. Das auf Höhe der Haupt-Terminationsbande wandernde Nukleotid der Sequenzleiter kann nicht direkt bestimmt werden, da auf allen 4 Spuren mit 3'-dNTP hier ein Signal zu sehen ist. Dieser Befund ist so zu erklären, daß sich bei RNA-Sequenzierung durch eine Transkriptionsreaktion das Terminationssignal auf allen Spuren bemerkbar macht.

Zwei Nukleotide oberhalb der Haupt-Terminationsbande beginnt auf der RNA-Sequenzleiter wieder ein eindeutig lesbarer Bereich mit der Basenfolge 5'-U-G-A-A-U-U-C-3' (Fig. 37A), was nach der DNA-Sequenz einer *EcoRI* Schnittstelle (GAATTC) entspricht. Dieser Bereich auf dem Fragment T ist nun eindeutig anhand der bereits bekannten DNA-Sequenz zu lokalisieren (Fig. 38A). Die Haupt-Terminationsbande B wandert nun zwei Nukleotide unterhalb des lesbaren U-Rests (Position 53 auf Fragment T, Fig. 38 A). Die Termination muß daher an einem G-Rest (Position 51) stattfinden, der auf die Reihe von 6 U-Resten nach der palindromen Sequenz folgt. Die Länge der Bande B beträgt somit genau 100 nt..

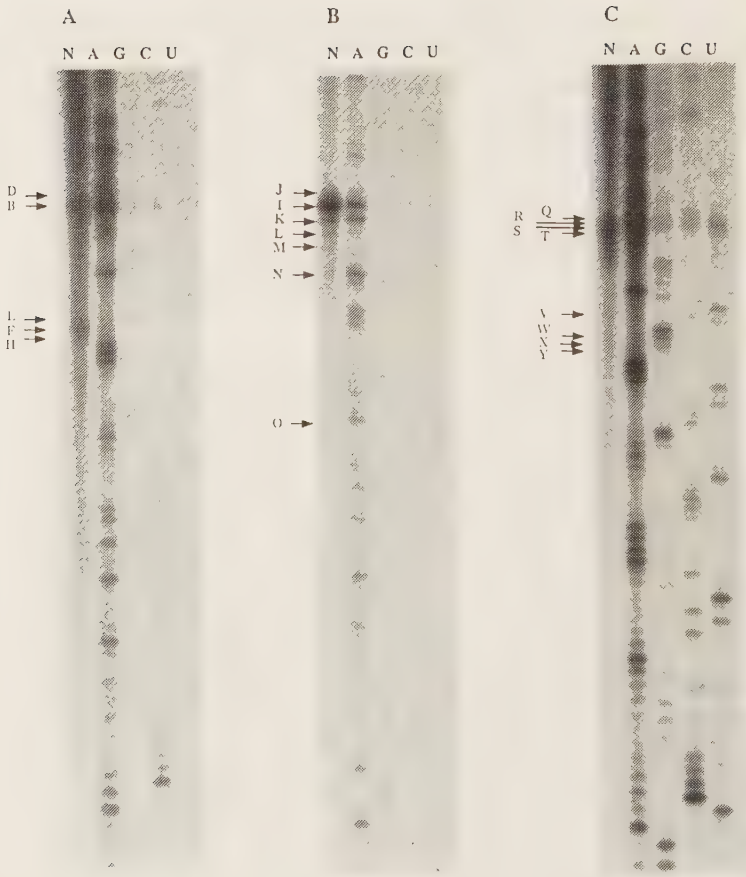


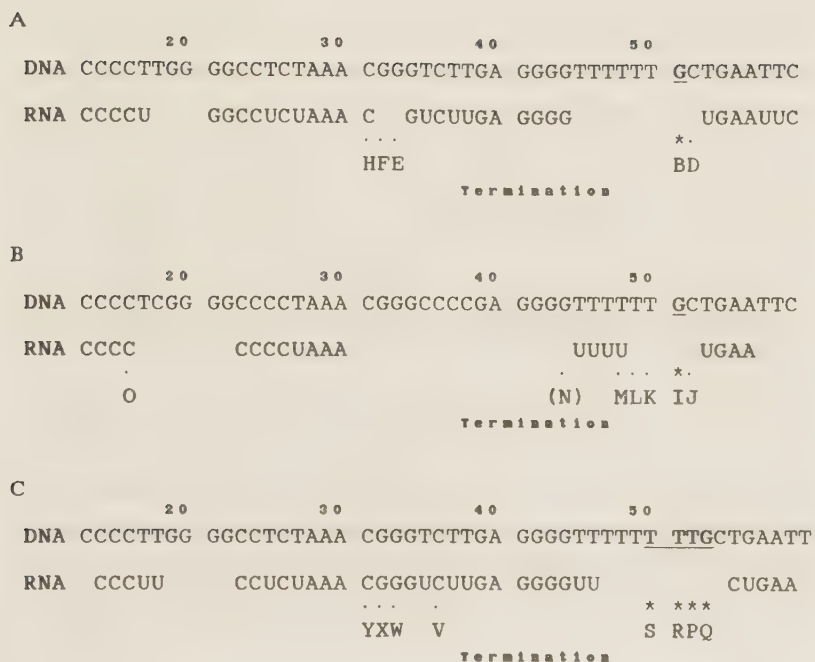
Fig. 37: Sequenzierung von Transkripten an den Plasmiden
pT7-4T, pT7-4S1 und pT7-4S2

Die Spur N entspricht einer *in vitro* Standard-RNA Synthese. Auf den Spuren A, G, C und U sind jeweils 3'-dATP, 3'-dGTP, 3'-dCTP oder 3'-dUTP anwesend. Die Auftrennung der Produkte erfolgte in einem 10%igen Polyacrylamid-Harnstoff-Gel. Die Erklärung der Banden erfolgt in Figur 38.

A: pT7-4T

B: pT7-4S1

C: pT7-4S2



**Fig. 38: Lokalisierung aller Terminationsstellen auf den Fragmenten
T, S1 und S2**

Die lesbaren Bereiche der RNA-Sequenz sind im Vergleich zur bekannten DNA-Sequenz der Matrize angegeben. Die Haupt- (*) und die minoren (·) Terminationsstellen sind bezeichnet.

A) pT7-4T

Die Haupt-Terminationsstelle B ist ein G-Rest, der hinter der U₆-Sequenz am 3'-Ende der RNA-Haarnadel des Terminators liegt.

B) pT7-4S1

Die Haupt-Terminationsstelle I ist ein G-Rest, der hinter der U₆-Sequenz am 3'-Ende der RNA-Haarnadel des Terminators liegt.

C) pT7-4S2

Auf dem Fragment S2 findet sich keine eindeutige Haupt-Terminationsstelle. Die Termination findet "stotternd" an den Stellen S, R, P und Q - den drei letzten U-Resten der U₈-Sequenz und dem nachfolgenden G-Rest am 3'-Ende der RNA-Haarnadel des Terminators statt.

Die Haupt-Terminationsstelle befindet sich also nur wenige Nukleotide vor der *EcoRI* Schnittstelle am Ende des Fragments T, was im Einklang mit den Ergebnissen aus 1.1. steht.

Bedingt durch geringe Terminationseffizienz und Auflösung der einzelnen Banden war in Kapitel 1.1. offenbar nur eine einzige Terminations-RNA gefunden worden. Dagegen wird hier noch eine schwächere Termination am Nukleotid direkt stromab der Haupt-Terminationsstelle beobachtet (Bande D). Nach der DNA-Sequenz des Fragments T handelt es sich dabei um einen C-Rest (Position 52 auf T) (Fig. 38A). Die drei zusätzlich auftretenden schwächeren Banden E, F und H auf Spur N sind anhand der Sequenzleiter als eine Basenfolge C-G-G zu identifizieren, die sich an Position 31 bis 33 von T befindet.

Der synthetische Terminator T besteht aus einem 50 bp langen Abschnitt des späten T7 Terminators TPhi. Obwohl die Termination an T mit wesentlich geringerer Effizienz als am 126 bp langen, TPhi enthaltenden, T7 Fragment *HinP* C stattfindet (vgl. Erg., 1.2. und 1.7.), ändert sich die Terminationsstelle bei T gegenüber der bereits bekannten Terminationsstelle bei TPhi bei Position 24209 auf dem T7 Genom (Dunn und Studier, 1983) nicht.

Eine Sequenzierung von an pT7-4S1/*XmnI* entstehenden Terminations-Transkripten (Fig. 37B) ergab auf Spur N (ohne 3'-dNTP) eine sehr intensive (I) und 6 schwächere (J, K, L, M, N, O) Banden.

Die intensivste Bande I wandert genau oberhalb einer Folge von U-Resten auf der Sequenzleiter. Wie bereits an pT7-4T (vgl. Fig. 37A) kann das auf Höhe von I wandernde Nukleotid nicht direkt von der Sequenzleiter abgelesen werden, weil auf allen 4 Spuren mit 3'-dNTP eine Bande auftritt. Zwei Nukleotide oberhalb von I ist auf der Sequenzleiter jedoch ein lesbarer Bereich 5'-U-G-A-A-3' zu erkennen. Da die DNA-Sequenz des Fragments S1 bekannt ist, kann diese Nukleotidfolge als Beginn der *EcoRI* Schnittstelle am Ende von S1 identifiziert werden (Fig. 38B). Die Haupt-Terminationsstelle auf pT7-4S1 muß daher an einem G-Rest liegen (Position 51 auf S1), der direkt nach 6 U-Resten folgt.

Eine weniger intensive Bande J ist bei +1 bezüglich der Haupt-Terminationsstelle zu erkennen, an dieser Position sollte sich nach der DNA-Sequenz von S1 ein C-Rest befinden (Position 52).

An den Positionen -3 bis -1 bezüglich der Haupt-Terminationsstelle (Position 48 bis 50) liegen die Terminationsstellen der Banden K, L und M. Hier befinden sich - nach der DNA-Sequenz von S1 - U-Reste (Fig. 38B). Auf der Sequenzleiter ist unterhalb der 6 U-Reste ein nicht lesbarer Bereich zu erkennen, in dem mehrere Banden auf den Spuren A, G und C die gleiche Mobilität besitzen. Darunter ist wieder eine (auf dem Original klar zu erkennende) Basenfolge 5'-C-C-C-C-U-A-A-A-3' zu lesen. Das entspricht der Sequenz im Bereich der Nukleotide von Position 23 bis 30 auf S1 (Fig. 38B). Daher muß es sich bei dem nicht lesbaren Abschnitt um eine Folge von 14 Basen 5'-C-G-G-G-C-C-C-C-G-A-G-G-G-G-3' handeln. Dieser Bereich besitzt eine wesentlich geringere Mobilität, als es seiner Länge entsprechen würde. Es ist hier eine Bandenkompression zu beobachten, die vermutlich durch die Anwesenheit einer sehr stabilen RNA-Sekundärstruktur entsteht. Diese Sekundärstruktur kann offenbar durch Aufkochen und denaturierende Gelelektrophorese (Meth., 5.4.) nicht irreversibel aufgelöst werden. Innerhalb dieses Bereichs mit Bandenkompression ist eine schwache Bande N zu beobachten, die keinem bestimmten Nukleotid zugeordnet werden kann. Die schwache Bande O befindet sich auf der Höhe eines C-Restes an Position 16 auf S1 (Fig. 38B).

Bei Vergleich von pT7-4T und pT7-4S1 wird deutlich, daß die Termination genau am selben Nukleotid, einem G-Rest nach 6 U-Resten, stattfindet. Da die Fragmente T und S1 gleich lang sind, sollten auch die an ihnen entstehenden Terminations-RNAs gleich lang sein. In Kapitel 1.1. wurde jedoch für die beiden RNA-Moleküle eine unterschiedliche Mobilität gefunden (vgl. Fig. 25). Bei RNA-Molekülen mit Sekundärstrukturen - wie den an pT7-4TS1 entstehenden Transkripten - erfolgt jedoch die Wanderung bei Gelelektrophorese nicht mehr genau proportional ihrer Länge (Grierson, 1982). So können die Verschiebungen in der Mobilität von "Run off" und Terminations-Transkripten an pT7-4S1 im Vergleich zu pT7-4T erklärt werden (vgl. Fig. 25).

Eine Sequenzierung von an pT7-S2/*Xmn*I entstehenden Terminations-RNAs (Fig. 37 C) zeigt auf Spur N (ohne 3'-dNTP) eine Folge von 4 intensiveren Banden (Q, R, S, T) und mit höherer Mobilität einige sehr schwache Banden (V, W, X, Y). Die 4 intensiveren Banden wandern in einem Bereich von 3 bis 6 Nukleotiden oberhalb einer Basenfolge 5'-G-A-

G-G-G-G-U-U-3' auf der Sequenzleiter, die anhand der DNA-Sequenz von S2 bei Position 39 bis 46 liegt (Fig. 38C). Daher müssen die 4 Terminationsstellen die Basenfolge U-U-U-G besitzen und an Position 50 bis 53 von S2 liegen (Fig. 38C). Ebenso wie bei pT7-4T und pT7-S1 kann die Base, an der eine Termination stattfindet, nicht direkt von der Sequenzleiter abgelesen werden, da dort auf mehreren Spuren Banden zu beobachten sind.

Außerdem ist eine sehr schwache Termination noch an einem C-Rest bei Position 36 von S2 (V), sowie an einer Nukleotidfolge C-G-G bei Position 31 bis 33 (W, X, Y) auf S2 zu beobachten. Diese Nukleotide sind direkt von der Sequenzleiter abzulesen, offenbar weil an ihnen nur eine sehr geringe Termination stattfindet.

Im Gegensatz zu den DNA-Fragmenten T und S1, wo die Termination überwiegend an Position 51, einem G-Rest, stattfindet, ist bei S2 keine eindeutige Haupt-Terminationsstelle zu sehen. Die Termination findet überwiegend an 4 Nukleotiden, den letzten 3 U-Resten einer Folge von 8 U-Resten und am nachfolgenden G-Rest statt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Kapitel 1.1., wo an pT7-4T und pT7-4S1 eine eindeutige Terminationstelle zu beobachten war, während an pT7-4S2 mehrere schwache Banden gefunden wurden.

1.6. Einfluß von Reaktionsbedingungen auf die Termination am DNA-Fragment T

Alle bisherigen Experimente zur Termination der *in vitro* RNA-Synthese am synthetischen DNA-Fragment T wurden bei Standard-Reaktionsbedingungen nach Schenborn und Mierendorf (1985) durchgeführt (vgl. Meth., 8.1.). Dabei wurde gefunden, daß der Terminator T nur eine sehr geringe Effizienz besitzt. Es sollte hier untersucht werden, ob durch Veränderung dieser Reaktionsbedingungen eine Verbesserung der Termination an T erreicht werden kann. So ist bekannt, daß die Termination der *in vitro* Transkription mit T7 RNA-Polymerase von der Ionenstärke (McAllister *et al.*, 1981) abhängig sein kann.

Bei allen Experimenten in diesem Kapitel wurde das mit *Xmn*I geschnittene Plasmid pT7-4T als Matrize verwendet. Die Produkte der RNA-Synthese an dieser Matrize wurden bereits in Kapitel 1.1. beschrieben, es

entstehen dort unter Standard-Transkriptionsbedingungen zwei definierte RNA-Moleküle. Eines davon ist das "Run off" Transkript A mit 505 nt. Länge, das vom T7 Promotor Phi 10 bis zur Schnittstelle für *XmnI* auf der Matrize reicht. Das andere RNA-Molekül B mit 100 nt. Länge entsteht durch eine spezifische Termination der RNA-Synthese am Ende des Fragments T (Fig. 39, Spur 1).

Eine quantitative Bestimmung der relativen Intensität dieser beiden Transkripte bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen geschah durch die densitometrische Auswertung von Autoradiographien.

Unter Standardbedingungen war die Intensität des "Run off" und des Terminations-Transkripts 35-45% bzw. 1-2% der gesamten Inkorporation von [α - 32 P] UMP in RNA-Moleküle (vgl. Tab. 1). Die restliche in RNA eingebaute Radioaktivität befindet sich in einer diffusen RNA-Spur, die mit zunehmender Nähe zum "Run off" Transkript A immer mehr an Intensität zunimmt. Diese RNA-Moleküle ohne definiertes 3'-Ende entstehen durch vorzeitige Termination der Transkription an beliebigen Stellen auf der Matrize wie bereits beschrieben (vgl. Erg., 1.1.). Je höher die Intensität der diffusen RNA-Spur bei einer Reaktion ist, desto seltener erreicht die T7 RNA-Polymerase bei der Transkription das Ende der Matrize und desto geringer ist die relative Intensität des "Run off" Transkripts. Der Anteil des "Run off" Transkripts - bei relativ konstanter Termination - an der gesamten RNA ist somit proportional zur mittleren Transkriptlänge (Prozessivität) der RNA-Polymerase.

Wie aus den mit * bezeichneten Werten in Tab. 1. ersichtlich ist, schwankten die Intensitäten des "Run off" Transkripts A um 10% und der Terminations-RNA B um 1% bei verschiedenen Experimenten unter gleichen Bedingungen. Intensitätsänderungen von A und B wurden daher nur als signifikant erachtet, wenn sie sich außerhalb dieser Streubreite befanden.

Untersucht wurden folgende Parameter einer *in vitro* Transkriptions-Reaktion:

- die Konzentration der DNA-Matrize
- der pH-Wert des Tris-HCl Puffers
- die Ionenstärke (und das Ersetzen von NaCl durch KCl)
- die Konzentration von Mg^{2+}
- die Ribonukleosidtriphosphat-Konzentration
- das Ersetzen von Mg^{2+} durch andere zweiwertige Ionen.

Tab. 1: Einfluß von Reaktionsparametern auf die RNA-Synthese an pT7-4T/Xmpl

Der Anteil (%) von "Run off" (A) und Terminations-Transkript (B) an der Gesamt-Inkorporation von [α - 32] UMP in RNA ist jeweils ohne Berücksichtigung der unterschiedlichen spezifischen Radioaktivität von A und B angegeben. Der auf 100% fehlende Anteil ist in einer "Schmierspur" enthalten. Die Reaktion unter Standard-Bedingungen ist immer gekennzeichnet (*).

Parameter	Variation	Gesamt-Inkorporation (Standard=100)	Anteil A (%)	Anteil B (%)
A Menge der DNA (μ g)	0.25	40	50	2
	1.0 (*)	100	35	1
	1.5	115	45	2
	2.0	165	40	3
B pH-Wert des Tris-HCl Puffers	7.0	75	60	1
	7.5	140	40	2
	8.0 (*)	100	40	1
	8.5	50	20	1
C Ionenstärke (mM)	10 (*)	100	40	1
	NaCl	25	55	1
		50	30	1
	10	130	30	2
	KCl	25	40	<1
		50	10	<1
D Konzentration von Mg^{2+}	1	25	80	3
	3	90	45	3
	6 (*)	100	35	2
	12	75	40	1
	18	75	30	1
E Art des zweiwertigen Kations (6 mM)	Mg (*)	100	45	2
	Mn	5	n.b.	n.b.
	Ca	5	35	5
	Sr	0	n.b.	n.b.
	Zn	0	n.b.	n.b.
	Co	0	n.b.	n.b.
	Ni	0	n.b.	n.b.
F Konzentration von NTP (mM)	0.05	100	20	1
	0.1	105	35	3
	0.5 (*)	100	45	2
	1.0	65	75	3
	(+: [UTP] = 0.1 mM)	0.5 +	220	5
		1.0 +	210	5

Zunächst wurde die gesamte Inkorporation von [α - 32 P] UMP in RNA betrachtet, die in Tab. 1 immer relativ zu den Standard-Reaktionsbedingungen (= 100%) angegeben ist. Sie sollte bei konstanter Substrat-Konzentration (NTPs) proportional zur RNA-Synthese sein, weil das Verhältnis von radioaktivem und nicht radioaktiven UTP ebenfalls konstant bleibt. Es wird gefunden, daß die gesamte RNA-Synthese etwa linear mit steigender DNA-Konzentration zunimmt (Tab. 1A), bei einem pH-Wert 7.5 des Tris-HCl Puffers (Tab. 1B) und der Standard-Mg $^{2+}$ -Konzentration von 6 mM (Tab. 1D) ein Maximum besitzt. Bei der Standard-Salzkonzentration von 10 mM ist sie mit KCl deutlicher höher als mit NaCl. Sie nimmt dann stark bei Erhöhung der NaCl- und noch erheblich stärker bei Erhöhung der KCl-Konzentration ab (Tab. 1C). Keinerlei RNA-Synthese findet bei Ersetzen von Mg $^{2+}$ durch Co $^{2+}$, Ni $^{2+}$, Sr $^{2+}$ oder Zn $^{2+}$ statt, dagegen ist eine geringe RNA-Synthese in Gegenwart von Ca $^{2+}$ und Mn $^{2+}$ zu beobachten (Tab. 1E). Bei Änderung der NTP-Konzentration im Reaktionsansatz kann die RNA-Synthese nicht mehr proportional zur Inkorporation von [α - 32 P] UMP sein, weil sich das Verhältnis von radioaktivem zu nicht radioaktivem UTP ändert. Die verwendete Menge von [α - 32 P] UTP liegt bei 1 μ Ci pro Ansatz (vgl. Meth. 8.1). Bei einer spezifischen Aktivität von 400 oder 3000 Ci/mmol bedeutet dies eine [α - 32 P] UTP-Konzentration im Bereich von 0,02 - 0,2 μ M, die sehr gering im Vergleich zu nicht radioaktiv markiertem UTP (50 - 1000 μ M) ist. So bedeutet die konstante Inkorporation von [α - 32 P] UMP bei Zunahme der Konzentration der nicht-radioaktiven NTPs von 0,05 mM auf 0,5 mM um den Faktor 10 (und gleichbleibender [α - 32 P] UTP-Konzentration) auch eine Zunahme der RNA-Synthese auf den zehnfachen Wert - direkt proportional zur Änderung der NTP-Konzentration. Eine weitere Verdopplung der NTP-Konzentration auf 1 mM führt dagegen zu einem 35%igen Rückgang der Inkorporation (Tab. 1F). Oberhalb einer Konzentration von 0,5 mM NTP scheint also die RNA-Synthese nicht mehr proportional mit der NTP-Konzentration zuzunehmen. Eine Verdopplung der Inkorporation von [α - 32 P] UMP in RNA ist bei selektiver Verringerung der UTP-Konzentration auf 0,1 mM gegenüber den anderen NTPs (0,5 oder 1 mM) zu sehen (Tab. 1F).



Fig. 39: *In vitro* RNA-Synthese an pT7-4T/*Xmn*I in Abhängigkeit von der UTP-Konzentration

Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte in einem 8%igen Polyacrylamid-Harnstoff-Gel. A ist das "Run off" Transkript vom T7 Promotor bis zur *XmnI* Schnittstelle. B ist die Terminations-RNA am Ende der Insertion T. C, D, E, F, G und H sind neu bei selektiver Verringerung der UTP-Konzentration auftretende Terminations-RNAs.

- 1: pT7-4T/*Xmn*I 0,5 mM NTP (Standard-Ansatz)
2: pT7-4T/*Xmn*I 0,5 mM ATP, GTP, CTP und 0,1 mM UTP

Als nächstes wurde der Anteil des "Run off" Transkripts A an der Inkorporation von [α - 32 P] UMP untersucht. Bei der nur geringen Effizienz des Terminators T ist diese Größe proportional zur Prozessivität der T7 RNA-Polymerase. Der Anteil von A wird nicht oder nur geringfügig von Änderungen der DNA-Konzentration (Tab. 1A), der Ionenstärke oder einem Austausch von NaCl gegen KCl beeinflusst (Tab. 1C). Dagegen nimmt der Anteil von A signifikant bei steigendem pH-Wert des Tris-HCl Puffers (Tab. 1B) und steigender Mg^{2+} -Konzentration (Tab. 1D) ab. Eine Erhöhung der Konzentration aller NTPs bewirkt einen deutlichen Anstieg der Intensität von A, während eine selektive Verringerung von UTP auf 0,1 mM keine Wirkung zeigt (Tab. 1F).

Bei Transkription in Gegenwart von Mn^{2+} sind keine Banden, sondern nur eine diffuse RNA-Spur zu sehen. Dagegen ist mit Ca^{2+} als zweiwertigem Kation das "Run off" Transkript A mit ähnlicher relativer Intensität wie mit Mg^{2+} zu erkennen (Tab. 1E).

Die relative Intensität der durch spezifische Termination am Ende des Fragments T entstehenden RNA B ändert sich bei keiner der untersuchten Reaktionsbedingungen so sehr, daß man die Termination an T als effizient bezeichnen könnte.

Keinen signifikanten Einfluß auf die Termination weisen die DNA-Konzentration (Tab. 1A) oder der pH-Wert des Tris-HCl Puffers auf (Tab. 1B). Eine Erhöhung der NaCl-Konzentration oder ein Ersetzen von NaCl durch KCl bei einer Konzentration von 10 mM hat ebenfalls keinen Einfluß auf die Termination. Dagegen ist bei Erhöhung der KCl-Konzentration keinerlei Termination mehr festzustellen (Tab. 1C). Bei steigender Mg^{2+} -Konzentration findet man eine Abnahme der Termination (Tab. 1D), die aber innerhalb des Streubereichs liegt. Daher ist ihre Signifikanz unklar.

In Gegenwart von Mn^{2+} statt Mg^{2+} wird keine Termination gefunden, jedoch bei Verwendung von Ca^{2+} ist eine Verbesserung der Termination von 2% auf 5% zu erkennen (Tab. 1E).

Bei gleichzeitiger Änderung der Konzentration aller NTPs ist kein signifikanter Einfluß auf die Termination festzustellen (Tab. 1F). Wenn aber die UTP-Konzentration selektiv um den Faktor 5 oder 10 gegenüber den anderen NTPs verringert wird, findet man eine signifikante Erhöhung der Termination im Bereich des Fragments T von 2% auf 5% (Tab. 1F).

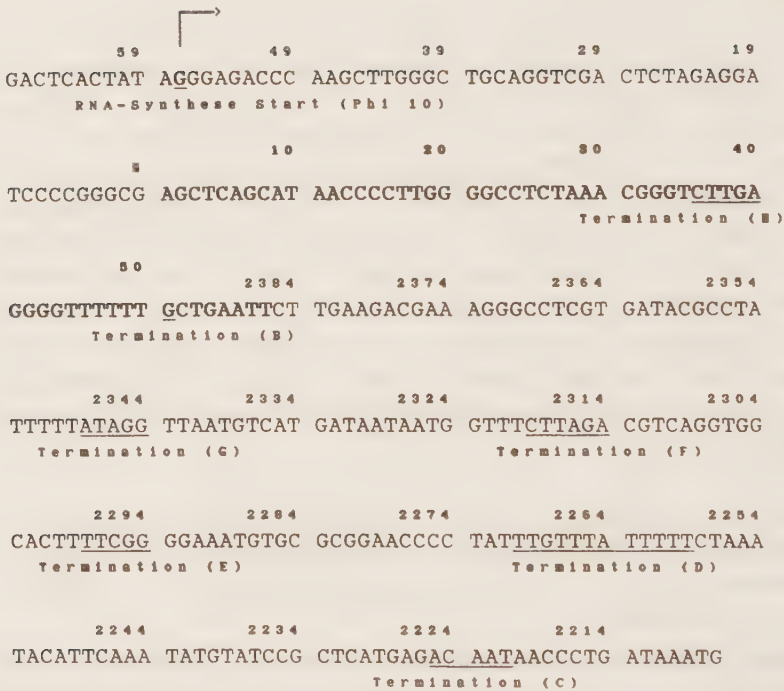


Fig. 40: Lokalisierung der durch selektive Verringerung der UTP-Konzentration entstehenden Terminationsstellen auf pT7-4T

Dargestellt ist der kodierende DNA-Strang von pT7-4T, dessen Nukleotidsequenz auch der RNA entspricht. Die RNA-Synthese auf Derivaten von pT7-4 beginnt bei Position 57 in Richtung kleinerer Nummern des Vektors (Fig. 5). Die Insertion T (fett) mit eigener Nomenklatur (fett) liegt zwischen der *SacI* (9) und der *EcoRI* Stelle (2386) des Vektors.

Die Transkripte C, D, E, F und G entstehen durch Termination im Bereich von Position 2222, 2259 bis 2270, 2296, 2316 und 2344 bis 2348 des Vektors. H entsteht durch Termination im Bereich von Position 37 von T. Daneben wird die - auch bei Transkription unter Standard-Bedingungen auftretende - RNA B gefunden, die durch Termination am Ende des Fragments T entsteht (Position 51).

Während jedoch bei Transkription unter Standard-Bedingungen nur das "Run off" Transkript A und die Terminations-RNA B auftraten, sind bei selektiver Verringerung der UTP-Konzentration (Fig. 39, Spur 1) 6 neue Banden C, D, E, F, G und H zu erkennen (Fig. 39, Spur 2). Durch Interpolation wurde ihre Länge mit 267 nt. (C), 224-233 nt. (D), 196 nt. (E), 176 nt. (F), 144-148 nt. (G) und 85 nt. (H) ermittelt.

Ebenso wie die RNA B sollten auch diese neu zu beobachtenden Transkripte durch Termination entstanden sein. Unter dieser Voraussetzung konnten ihre Terminationsstellen auf pT7-4T bestimmt werden. Dabei ergaben sich in etwa die Positionen (auf dem Vektor) 2222 für C, 2259 bis 2270 für D, 2296 für E, 2316 für F und 2344 bis 2351 für G (Fig. 40). Die Terminationsstelle von H liegt an Position 37 der Insertion T (Fig. 40).

Bei Betrachtung der Terminationsstellen von D, E, F und G fällt auf, daß sie immer gegen Ende einer T-reichen Region auf dem kodierenden DNA-Strang, also einer U-reichen Region auf der RNA liegen (Fig. 40).

Die selektive Verringerung der UTP-Konzentration im Vergleich zu den anderen Triphosphaten führt also zum Entstehen neuer Terminationsstellen nach einer U-reichen Region auf der RNA. Bei diesen speziellen Reaktionsbedingungen muß sich 5'-stromaufwärts dieser oligo(rU) Sequenz keine Palindrom auf der Matrize befinden, wie es gewöhnlich bei *E. coli* Terminatoren (Rosenberg und Court, 1979) und auch dem T7 Terminator TPhi (Dunn und Studier, 1983) der Fall ist.

Die Terminationsstelle für das Transkript C besitzt allerdings keine bemerkenswerten strukturellen Eigenschaften, es ist hier weder ein palindromer Bereich, noch eine Folge von T-Resten auf der Matrize zu beobachten (vgl. Fig. 40).

Die Terminationsstelle von H liegt innerhalb des DNA-Fragments T ca. 15 nt. vor der Haupt-Terminationsstelle. In diesem Bereich wurde auch bei der Transkriptsequenzierung eine schwache Termination festgestellt (vgl. Erg., 1.5.). Die Effizienz dieser schwächeren Terminationsstelle erhöht sich deutlich durch die selektive Verringerung der UTP-Konzentration.

1.7. Bestimmung der Effizienz von T7 Terminatoren

Eine Termination der *in vitro* RNA-Synthese durch T7 RNA-Polymerase wurde an den T7 Terminatoren T, S1, S2 und TPhi (Fragment *HinP* C), sowie an den *E. coli* Terminatoren *rmb*-T1 und *rmb*-T2 und auf dem *E. coli* 3d^{rtf} Gen (Rif-TA, Rif-TB) gefunden. In diesem Abschnitt sollte die Effizienz – die Zahl der Transkripte, deren Synthese an einem Terminator endet, gegenüber der Gesamtzahl der Transkripte – dieser Terminatoren quantitativ bestimmt werden.

Die Bestimmung der Effizienz von Terminatoren erfolgte zunächst an geschnittenen DNA-Matrizen. Bei Auswahl der Schnittstellen wurde auf einen relativ geringen Abstand zum 3'-Ende des Terminators geachtet, um den Anteil der durch unspezifische Termination entstehenden diffusen RNA-Spur (vgl. Erg. 1.6.) möglichst gering zu halten.

Bei Spaltung der Plasmide mit den verwendeten Enzymen entstanden immer mehrere Fragmente. Dies war jedoch für die Transkriptionsreaktion unerheblich, da immer nur eines davon den T7 Promotor Phi 10 enthält, an dem eine effiziente Initiation der Transkription möglich ist.

Die Plasmide pT7-4T, pT7-4S1 und pT7-4S2 (Fig. 6) mit den synthetischen Terminatoren T, S1 und S2 wurden mit *HinPI* (Schnittstelle bei Position 2285 auf dem Vektor) gespalten. Auf dem 2388 bp großen Vektor pT7-4 (ohne Insertion) beträgt der Abstand zwischen dem T7 Promotor (Position 57) und der *HinPI* Stelle 160 bp ($57 + 2388 - 2285$). Bedingt durch die 58 bp langen Insertionen T bzw. S1 und die 10 bp lange Deletion zwischen *EcoRI* und *SacI* Stelle müssen die "Run off" Transkripte an pT7-4T und pT7-4S1 208 nt. lang sein ($160 + 48$). Da die Insertion S2 60 bp lang ist, muß an pT7-4S2 ein "Run off" Transkript mit 210 nt. Länge entstehen (Fig. 41). Die Terminations-Transkripte sind an pT7-4T und pT7-4S1 jeweils 100 nt. und an pT7-4S2 99 bis 102 nt. lang (vgl. Erg., 1.5.).

Mit *HinPI* geschnitten wurde auch das Plasmid pT7-4TPhiR (Fig. 9) mit dem Terminator TPhi auf dem 126 bp langen Fragment *HinP* C (Position 24103 bis 24229 von T7). Das *HinPI* "Run off" Transkript an pT7-4TPhiR ist 286 nt. ($160 + 126$) lang (Fig. 41). Bei einem Ende der Transkription am selben Nukleotid (24209) wie auf dem T7 Genom muß die an TPhi endende Terminations-RNA 134 nt. lang sein (vgl. Erg., 1.2.).

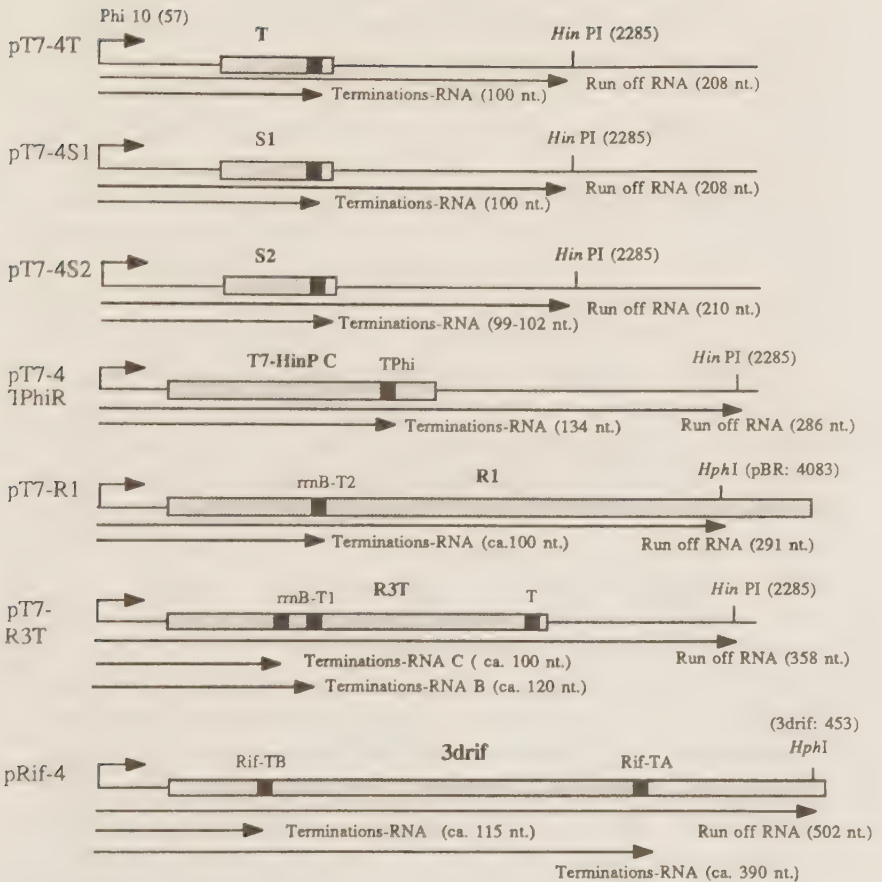


Fig. 41: Länge von "Run off" und Terminations-Transkripten bei der Bestimmung der Terminationseffizienz

Die Länge aller "Run off" Transkripte wurde aus der Nukleotidsequenz der Matrizen bestimmt (vgl. Text).

Die Länge von einigen Terminations-Transkripten kann exakt (bei bekannten Terminationsstellen) bestimmt werden. Ansonsten ist ihre Länge näherungsweise (ca.) angegeben.

Das Plasmid pT7-R3T (Fig. 14), auf dem sich der Terminator *rrnB*-T1 und dahinter der Terminator T befinden, wurde ebenfalls mit *Hin*PI gespalten. Dabei entsteht ein bereits beschriebenes (Fig. 31D) 358 nt. langes "Run off" Transkript (Fig. 41). Die an *rrnB*-T1 entstehenden Terminations-RNAs sind ca. 100 (C') und ca. 120 nt. (B2' und B1') lang (Fig. 31D).

Das Plasmid pT7-R1, auf dem sich der Terminator *rrnB*-T2 befindet, wurde mit dem Enzym *Hph*I geschnitten. Die *Hph*I Stelle befindet sich 263 bp hinter dem Beginn der Insertion R1 (Position 4083 auf dem pBR322 Anteil von R1). Bei einer Entfernung vom T7 Promotor bis zur *Acc*I Stelle (Positionen 57 bzw. 29 des Vektors) von 28 bp ist das "Run off" Transkript 291 nt. (263 + 28) lang. Die Länge der Terminations-RNA an *rrnB*-T2 wurde mit ca. 100 nt. bestimmt (Fig. 31B)

Das Plasmid pRif-4 mit den beiden Terminatoren Rif-TB und Rif-TA wurde ebenfalls mit *Hph*I geschnitten. Die *Hph*I Stelle befindet sich an Position 453 auf 3d^{rif}. Da die Entfernung vom T7 Promotor bis zum Beginn von 3d^{rif} 37 bp beträgt, muß das "Run off" Transkript 490 nt. (453 + 37) lang sein (Fig. 41).

Die Transkriptionsreaktionen wurden bei 0,1 mM bzw. 0,5 mM NTP durchgeführt. Auf den Autoradiogrammen wurden Transkripte mit der erwarteten Mobilität gefunden. Die Intensität der einzelnen Banden wurde densitometrisch bestimmt. Durch die Lage der Schnittstellen (nicht weit 3'-stromabwärts der Terminatoren) war die Intensität der durch vorzeitige Termination entstehenden diffusen RNA-Spur (vgl. Erg., 1.6.) vernachlässigbar gering. Die am langsamsten wandernde Bande auf jeder Spur war - wie bisher - die "Run off" RNA vom Promotor Phi 10 bis zum Ende der Matrize. Die Intensität dieser Bande I_r(R) wurde gleich 100% gesetzt und die Intensität der durch Termination entstehenden und schneller wandernden Bande(n) auf der gleichen Spur relativ dazu angegeben. Der gemessene Wert für die relative Intensität einer Terminations-RNA X I_r(X) mußte anschließend noch um einen Faktor korrigiert werden, der die unterschiedliche Zahl von radioaktiv markierten U-Resten im "Run off" und im Terminations-Transkript berücksichtigt (vgl. Tab. 2). Die Anzahl der U-Reste in "Run off"- $\nu_r(R)$ und in Terminations-Transkripten $\nu_r(X)$ wurde anhand der Nukleotidsequenz der Matrize und der bekannten Lage von Terminationsstellen ermittelt.

So errechnet sich die relative korrigierte Intensität I_{rk} der Bande einer Terminations-RNA X aus der gemessenen relativen Intensität $I_r(X)$:

$$I_{rk}(X) = I_r(X) \cdot n_v(R) / n_v(X) \quad (1)$$

Befindet sich auf einer Matrize nur ein einziges Terminationssignal X, so findet man die Terminationseffizienz $TE(X)$ nach folgender Formel :

$$\begin{aligned} TE(X) &= I_{rk}(X) / [I_{rk}(X) + I_r(R)] \\ &= I_{rk}(X) / [I_{rk}(X) + 100] \end{aligned} \quad (2)$$

Befinden sich auf einer Matrize zwei Terminationsstellen X und Y, von denen X näher am T7 Promotor als Y liegt und nimmt man an, daß eine Termination an jeder Stelle unabhängig voneinander erfolgt, so läßt sich die Effizienz bei X $TE(X)$ und bei Y $TE(Y)$ nach folgenden Gleichungen ermitteln:

$$\begin{aligned} TE(X) &= I_{rk}(X) / [I_{rk}(X) + I_{rk}(Y) + I_r(R)] \\ &= I_{rk}(X) / [I_{rk}(X) + I_{rk}(Y) + 100] \end{aligned} \quad (3)$$

$$\begin{aligned} TE(Y) &= I_{rk}(Y) / [I_{rk}(Y) + I_r(R)] \\ &= I_{rk}(Y) / [I_{rk}(Y) + 100] \end{aligned} \quad (4)$$

Die nach diesen Formeln errechneten Werte für die Effizienz der einzelnen Terminatoren sind in Tab. 2 angegeben.

Die Effizienz des synthetischen Terminators T liegt bei beiden NTP-Konzentrationen etwa im Bereich zwischen 5 und 10% (Tab. 2). Es ist keine signifikant scheinende Änderung in der Termination an T in Abhängigkeit von der NTP-Konzentration zu beobachten, was in Einklang mit den Ergebnissen aus Kapitel 1.6. steht.

Die Effizienz des synthetischen Terminators T ist im Vergleich zu TPhi auf dem T7 Fragment *HinP C* (ca. 30-40% Effizienz) um das drei- bis vierfache geringer (Tab. 2). Weiterhin fällt auf, daß bei 0,5 mM NTP sich die Effizienz von TPhi deutlich erhöht.

Vergleicht man T mit dem Terminator S2, der durch Mutation von T entstand (Fig. 2), findet man bei beiden dieselbe Effizienz (Tab. 2).

Tab. 2: Effizienz von T7 Terminatoren an einer geschnittenen Matrize

Die Effizienz TE der in der Tabelle angegebenen Terminatoren wurde unter Berücksichtigung der unterschiedlichen spezifischen Radioaktivität von "Run off" und Terminations-Transkripten errechnet (Erläuterungen siehe Text).

Matrize	pT7-4 T	pT7-4 S1	pT7-4 S2	pT7-4 TPhiR	pT7-R3T		pT7- R1	pRif-4	
Schnitt	<i>Hin</i> PI	<i>Hin</i> PI	<i>Hin</i> PI	<i>Hin</i> PI	<i>Hin</i> PI		<i>Hph</i> I	<i>Hph</i> I	
Terminator	T	S1	S2	TPhi	<i>rrnB</i> T1-C	<i>rrnB</i> T1-B	<i>rrnB</i> T2	Rif -TB	Rif -TA
Run off RNA (Länge)	208	208	210	286	358		291	490	
U-Reste nu (R)	57	52	58	67	95		81	131	
Termination RNA (Länge)	100	100	99- 102	134	ca. 100	ca. 120	ca. 100	ca. 115	ca. 390
U-Reste nu (X)	22	17	21- 23	28	ca. 19	ca. 34	ca. 13	ca. 23	ca. 104
A NTP = 0.1 mM									
I _r (X) gemessen	3	38	3	13	1409	140	6	42	213
I _{r k} (X) korr.	8	116	8	31	7045	391	37	239	268
TE (%)	7	54	7	24	93	80	27	39	73
B NTP = 0.5 mM									
I _r (X) gemessen	4	18	4	27	248	225	2	21	46
I _{r k} (X) korr.	10	55	10	65	1240	629	12	120	58
TE (%)	9	36	9	39	63	86	11	43	37

Die Verlängerung der olig(dT)Sequenz um zwei Nukleotide bei S2 im Vergleich zu T hat bei diesem Experiment keinen messbaren Einfluß auf die Effizienz der Termination.

Der Terminator S1, der ebenfalls durch Mutation von T konstruiert wurde, ist wesentlich effizienter als T. Bei 0,1 mM NTP ist die Effizienz von S1 mit 54% etwa achtmal höher als die von T und mehr als doppelt so hoch als die von TPhi. Bei 0,5 mM NTP verringert sich die Effizienz von S1 auf 36%. Sie ist unter diesen Bedingungen immer noch so hoch wie an TPhi und viermal höher als an T (Tab. 2). Bedingt durch die Stabilisierung der RNA-Sekundärstruktur erreicht S1 eine mindestens ebenso hohe Effizienz wie TPhi auf dem 126 bp langen T7 Fragment *HinP* C.

Bei *rmB*-T1 auf pT7-R3T findet man zwei starke Terminationsstellen in der Mitte (C) und gegen Ende (B - B1 + B2) des Palindroms (Fig. 32A). Jede dieser Terminationsstellen besitzt alleine eine sehr hohe Effizienz von über 60% (Tab. 2). An B und C zusammen wird die RNA-Synthese bei 0,1 mM NTP zu 99% und bei 0,5 mM NTP zu 95% terminiert. Damit ist *rmB*-T1 der mit Abstand stärkste von allen in dieser Arbeit untersuchten Terminatoren. Die Effizienz an den einzelnen Stellen B und C verhält sich unterschiedlich bei Änderung der NTP-Konzentration. So nimmt die Termination in der Mitte des Palindroms (C) bei 0,5 mM NTP deutlich ab, während die Termination am Ende des Palindroms (B - B1 + B2) bei 0,1 mM und 0,5 mM NTP gleich bleibt (Tab. 2).

rmB-T2 ist im Vergleich zu *rmB*-T1 nur ein sehr schwacher Terminator, dessen Effizienz bei 0,1 mM NTP mit 25% aber immerhin im Bereich von TPhi liegt. Bei einer NTP-Konzentration von 0,5 mM findet bei *rmB*-T2 jedoch eine starke Abnahme der Effizienz auf 10% statt (Tab. 2).

Die beiden Terminatoren auf dem 3d^{r1f} Gen, Rif-TB und Rif-TA besitzen beide eine recht hohe Effizienz. An Rif-TB mit der Struktur eines klassischen *E. coli* Terminators (Fig. 36A) beträgt die Terminationseffizienz etwa 40% und ist nicht von der NTP-Konzentration abhängig (Tab. 2). Die Effizienz von Rif-TB ist somit höher als die von TPhi. Die Effizienz von Rif-TA, dessen Sequenz von einem *E. coli* Terminator verschieden ist (Fig. 36B), ist bei 0,1 mM NTP mit ca. 70% sehr hoch. Sie nimmt bei 0,5 mM NTP auf 40% ab, ist aber immer noch ebenso hoch wie von TPhi oder Rif-TB (Tab. 2).

Die in diesem Abschnitt untersuchten T7 Terminatoren umspannen bei *in vitro* Transkription an geschnittener Matriz e einen weiten Effizienzbereich

von 5 bis 95%. Bei einigen davon (*rmb*-T2, S1 und Rif-TA) nimmt die Effizienz stark mit sinkender NTP-Konzentration ab, während sie bei anderen etwa gleich bleibt (T, S2, *rmb*-T1, Rif-TB) oder sogar ansteigt (TPhi).

Jetzt stellte sich die Frage, ob sich die Effizienz dieser Terminatoren bei Verwendung einer Matrize ohne Restriktionsschnitt ändert. Dazu wurden T, S1, S2, TPhi und *rmb*-T1 in die Plasmide pCat-4 bzw. pCat-6 hinter das Cat-Gen eingebaut (Meth., 6.6.). Auf diese Weise wurden pCat-4T, pCat-4S1 und pCat-4S2 (Fig. 19) mit den Terminatoren T, S1 bzw. S2, sowie pCat-6T (Fig. 19), pCat-6Phi und pCat-6R (Fig. 21) mit T, TPhi bzw. *rmb*-T1 konstruiert.

Es erfolgte ein Vergleich der Produkte einer *in vitro* RNA-Synthese an pCat-4 (Fig. 42, Spur 1), pCat-4T (Spur 2), pCat-4S1 (Spur 3), pCat-4S2 (Spur 4), pCat-6T (Spur 5), pCat-6Phi (Spur 6), pCat-6R (Spur 7) ohne Restriktionsschnitt und an mit *Bam*HI geschnittenem pCat-4 (Spur 8). Bei diesem Experiment war eine hohe Prozessivität der T7 RNA-Polymerase erforderlich, da die Länge der Transkripte an den Cat-Plasmiden vom T7 Promotor bis zu den Terminationsstellen hinter der 1,7 kb langen Cat-Insertion bereits ca. 1800 nt. beträgt. Deshalb wurde die Reaktion bei einer NTP-Konzentration von 1 mM NTP durchgeführt (vgl. Tab. 1F).

Bei der RNA-Synthese an pCat-4 ohne Restriktionsschnitt ist eine Bande A mit sehr geringer Mobilität zu sehen (Fig. 42, Spur 1). Da sich auf pCat-4 kein Terminator befindet, handelt es sich bei A vermutlich um keine uniforme RNA-Spezies mit definiertem 3'-Ende. A sollte durch unspezifische Termination entlang der Matrize entstehen (vgl. Fig. 26) und erscheint nur auf Grund der geringen Mobilität (bedingt durch die große Transkriptlänge) als definierte Bande.

An mit *Bam*HI geschnittenem pCat-4 ist eine Bande B mit höherer Mobilität zu sehen (Spur 8). Bei B muß es sich um ein "Run off" Transkript vom Promotor Phi 10 bis zum Ende der Matrize an der *Bam*HI Stelle handeln, die sich direkt hinter der Cat-Insertion befindet (Fig. 19). Die Länge von B beträgt demnach 1775 nt. (1761 nt. von Cat und 14 nt. vom Vektor).

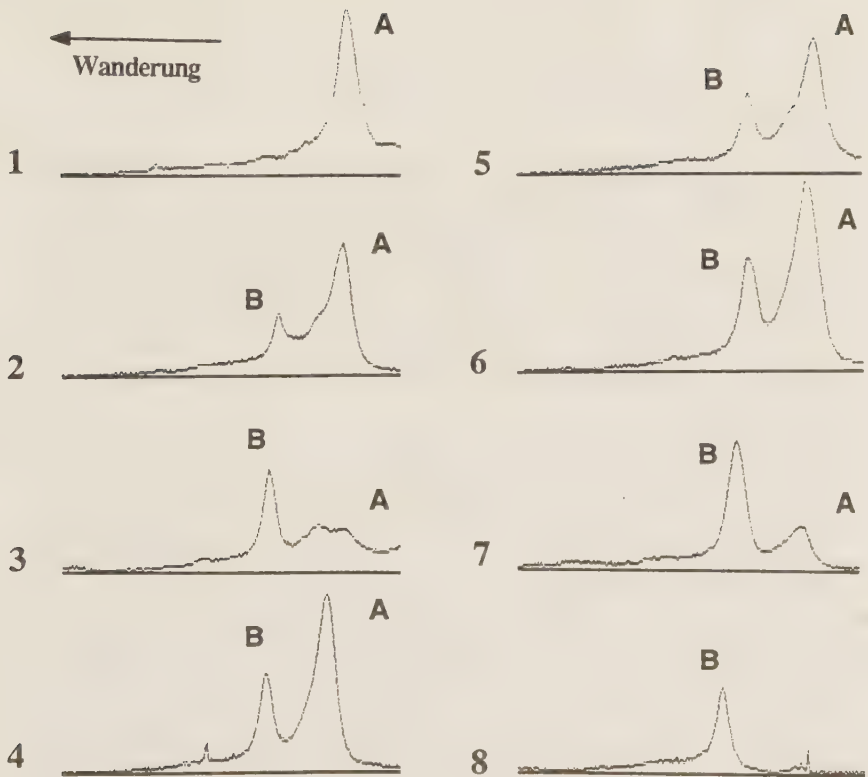


Fig. 42: *In vitro* RNA-Synthese an Cat-Plasmiden

Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte in einem 4%igen Polyacrylamid-Harnstoff-Gel. Die Bande A entsteht durch unspezifische Termination 3'-stromabwärts der Cat-Insertion. Die Bande B ist auf Spur 1 bis 7 (Matrize ohne Restriktionsschnitt) eine Terminations-RNA und auf Spur 8 (Matrize mit Restriktionsschnitt) ein "Run off" Transkript. Bei der densitometrischen Auswertung wurde auf allen Spuren ein gleicher Standard (entsprechend 100%) verwendet.

1: pCat-4

5: pCat-6T

2: pCat-4T

6: pCat-6Phi

3: pCat-4S1

7: pCat-6R

4: pCat-4S2

8: pCat-4/ *Bam*HI

Bei Plasmiden mit einem Terminator hinter dem Cat-Gen (Spuren 2 bis 7) sind jeweils zwei Banden zu sehen, die wie A und B wandern. Dabei ist die Intensität der schneller wandernden Bande B bei pCat-6R (Spur 7) und pCat-4S1 (Spur 3) am höchsten und bei pCat-4T (Spur 2) und pCat-6T (Spur 5) am geringsten.

Auf den untersuchten Plasmiden befinden sich die Terminatoren direkt 3'-stromabwärts der Cat-Insertion (Fig. 19 und 21). Eine an ihnen entstehende Terminations-RNA ist somit ca. 1800 - 1900 nt. lang und muß dieselbe Mobilität wie B besitzen. Deshalb sollte die an allen Plasmiden mit Terminator, aber nicht an pCat-4 (ohne Terminator) zu beobachtende Bande B durch Termination nach der Cat-Insertion entstanden sein. Die Intensität von B wäre dann ein Maß für die Stärke des Terminators.

Transkripte, die wie A wandern, sind auch an allen Plasmiden mit Terminator zu sehen (vgl. Fig. 42) und müssen von RNA-Molekülen stammen, bei denen die Terminationsstelle hinter der Cat-Insertion überlesen wurde. Die Intensität von A wäre daher ein Maß für die Durchlässigkeit des Terminators.

Bei Transkription an einer ungeschnittenen Matrize ist keine genaue Bestimmung der Effizienz von Terminatoren möglich. Man findet zwar ein Terminations-, aber kein "Run off" Transkript mit definierter Länge, das für die Berechnung von TE nach Gleichungen (1) bis (4) auf S. 132 notwendig ist. So existiert kein Korrekturfaktor, der die geringere Zahl von U-Resten in einem Terminations-Transkript gegenüber RNA-Molekülen berücksichtigt, die durch Überlesen des Terminators entstanden sind.

Da die Terminations-Transkripte B und die durch Überlesen der Terminatoren entstandenen Transkripte A an allen Matrizen jeweils gleich lang sein sollten (vgl. Fig. 42), ist eine Bestimmung der Effizienz aber näherungsweise möglich. Dies geschieht so, daß zunächst der Anteil von A und B (I_A und I_B) an der gesamten Inkorporation von [α - 32 P] UMP in RNA-Gipfel densitometrisch bestimmt wurde.

Aus I_A und I_B kann nun die relative Stärke des Terminators X errechnet werden:

$$T_R(X) = I_B / (I_A + I_B) \quad (5)$$

Tab. 3: Effizienz von T7 Terminatoren an ungeschnittenen Matrizen

Die genäherte Terminationseffizienz TE^* wurde aus der relativen Stärke der einzelnen Terminatoren errechnet (Erläuterungen siehe Text).

Der Anteil von A entspricht der Radioaktivität in RNA-Molekülen, die durch Überlesen des Terminators entstanden. Die Anteil von B entspricht der Radioaktivität in Terminations-Transkripten.

Die *in vitro* Transkription wurde in Gegenwart von 1 mM NTP durchgeführt.

Matrize	pCat -4	pCat -4T	pCat -4S1	pCat -4S2	pCat -6T	pCat -6Phi	pCat -6R
Terminator	-	T	S1	S2	T	TPhi	<i>rrnB</i> -T1
Anteil A I_A (%) Über- lesen	100	75	44	66	70	68	27
Anteil B I_B (%) Termina- tion	0	19	47	23	20	26	58
rel. Stärke B $T_R = I_B /$ $I_A + I_B$	0	20	52	26	22	27	68
genäher- te Effi- zienz TE^*	0	34	68	41	36	43	81

Diese relative Stärke T_R darf jedoch nicht direkt mit der Terminationseffizienz TE (vgl. Tab. 2) verwechselt werden, da die unterschiedliche spezifische Radioaktivität der Transkripte A und B hier nicht berücksichtigt wird.

Nimmt man aber (auf Grund der Mobilität von A und B) näherungsweise an, daß ein durch Überlesen des Terminators entstandenes Transkript A in etwa die doppelte Länge eines Terminations-Transkripts B besitzt (damit auch die doppelte Zahl von U-Resten) und eine doppelt so hohe spezifische Radioaktivität wie B aufweist, so läßt sich damit die genäherte Terminationseffizienz TE^* eines Terminators X ermitteln:

$$TE^*(X) = 2 I_B / (I_A + 2 I_B) \quad (6)$$

Auf diese Weise können die Werte für TE^* (vgl. Tab. 3) jetzt mit den Werten für TE aus Tab. 2 verglichen werden.

Die Termination am Terminator T (auf pCat-4T und pCat-6T) mit jeweils ca. 35% (vgl. Tab. 3) erfolgt hinter dem Cat-Gen an einer Matrize ohne Restriktionsschnitt wesentlich effizienter als an einer geschnittenen Matrize und ohne das Cat-Gen mit 5 - 10% (vgl. Tab. 2).

Wie bei Verwendung einer geschnittenen Matrize erfolgt auch an ungeschnittener Matrize die Termination an *rrnB*-T1 auf pCat-6R mit einer Effizienz von ca. 80% (Terminationsstellen B + C) am stärksten. Im Vergleich zur geschnittenen Matrize mit 95 bzw. 99% (B + C) ist die Effizienz der Termination an *rrnB*-T1 hier allerdings deutlich geringer.

Die Terminatoren S1 und S2 sind mit ca. 70% bzw. 40% deutlich effizienter als an geschnittener Matrize, während die Effizienz des Terminators TPhi auf dem T7 Fragment *HinP* C mit ca. 45% sich ebenfalls - aber nicht so deutlich - erhöht (Tab. 3).

Der Unterschied in der Effizienz von T und TPhi ist an einer Matrize ohne Restriktionsschnitt mit nur ca. 10% (vgl. Tab. 3) erheblich geringer als an geschnittener Matrize mit 20 - 30% (vgl. Tab. 2).

Auch wird bei diesem Experiment gefunden, daß der modifizierte Terminator S2 mit 8 T-Resten (gegenüber 6 T-Resten beim Terminator T) eine um 5% höhere Effizienz als T besitzt (vgl. Tab. 3). Dagegen konnte für die Effizienz von T und S2 bei Verwendung einer Matrize mit Restriktionsschnitt kein Unterschied gefunden werden (vgl. Tab. 2).

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Effizienz von einigen T7 Terminatoren *in vitro* stark von den Reaktionsparametern abhängig sein kann. Es ist auch erkennbar, daß die Nukleotidsequenz in der Umgebung des Terminators und die Topologie der DNA-Matrize (linear oder zirkulär) eine Rolle bei der Termination spielen.

Die Reihenfolge der Effizienz derjenigen Terminatoren, die an einer Matrize mit und ohne Restriktionsschnitt, sowie mit und ohne Cat-Gen vor dem Terminator untersucht wurden (vgl. Tab. 2 und Tab. 3), bleibt mit $mB-T1 > S1 > TPhi > S2 \geq T$ jedoch im wesentlichen erhalten.

2. UNTERSUCHUNGEN ZUR TERMINATION *IN VIVO*

2.1. RNA-Synthese an T7-Plasmiden mit dem Tetracyclin-Resistenzgen

Eine Termination der Transkription durch T7 RNA-Polymerase *in vivo* wurde bisher nur am T7 Terminator TPhi auf dem T7 Genom (McAllister und McCarron, 1977) oder auf Plasmiden mit mehr als 1000 bp langen T7 Fragmenten nachgewiesen (McAllister *et al.*, 1981; Studier und Moffat, 1986). In diesem Kapitel sollte untersucht werden, ob der synthetische Terminator T, der aus einem nur 50 bp langen Bereich des T7 Genoms (24164 bis 24214) besteht (vgl. Erg., 1.1.) und *in vitro* eine im Vergleich zu TPhi auf dem 126 bp langen T7 Fragment *HinP C* (24103 bis 24229) geringe Terminationseffizienz besitzt (vgl. Erg., 1.7.), auch *in vivo* wirksam ist. Dieser Nachweis sollte durch Northern-Hybridisierung von zellulärer RNA aus *E. coli* Bakterien mit aktiver T7 RNA-Polymerase geschehen.

Dazu wurde das in Meth., 9.1. beschriebene induzierbare T7 Expressionssystem von Tabor und Richardson (1985) verwendet, das zwei miteinander kompatible Plasmide in einer Zelle enthält. Auf dem einem Plasmid befindet sich ein Gen unter Kontrolle des T7 Promotors Phi 10. Das andere Plasmid pGP1-2 (Fig. 22) enthält das T7 RNA-Polymerase Gen, das bei Induktion exprimiert wird, so daß Transkription des Gens unter Kontrolle von Phi 10 *in vivo* erfolgen kann. Die T7 Promotor-Plasmide wurden deshalb zur Untersuchung der RNA-Synthese *in vivo* oder der

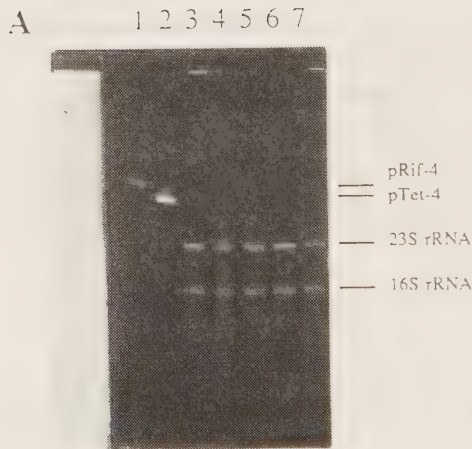


Fig. 43: Northern-Hybridisierung gegen zelluläre RNA aus pTet-4T, pBR322 und pRif-4

A) Abbild eines Agarose-Harnstoff-Gels

Innerhalb der diffusen RNA-Spur (zelluläre mRNA) sind die Banden der 23S und der 16S rRNA zu erkennen. Die Spuren 3 bis 7 entsprechen den Spuren 1 bis 5 in Fig. 43B.

Auf den Spuren 1 und 2 wurden die Plasmide pRif-4 und pTet-4 ohne Restriktionsschnitt aufgetragen.

B) Northern-Hybridisierung

Als radioaktive Probe wurde das mit [α - 32 P] dCTP nick-translatierte Tet-Fragment verwendet.

Die Synthese von zum Tet-Gen homologer RNA wurde in K38/pGP1-2 Bakterien ohne (-) und mit (+) Induktion untersucht.

Die Banden A, A' und A'', B und B' bzw. C und C' stammen von Plasmid-DNA (pTet-4T, pBR322 bzw. pRif-4). X und Y entstehen durch Kreuz-Hybridisierung der radioaktiven Probe mit 23S und 16S rRNA. Die diffuse Spur auf Spur 2 und 3 stammt von Tet-mRNA ohne definiertes 3'-Ende. Bei D handelt es sich um eine - durch Termination am Terminator T entstandene - Tet-mRNA-Spezies mit definiertem 3'-Ende. Bei der densitometrischen Auswertung wurde auf allen Spuren ein gleicher Standard (entsprechend 100%) verwendet.

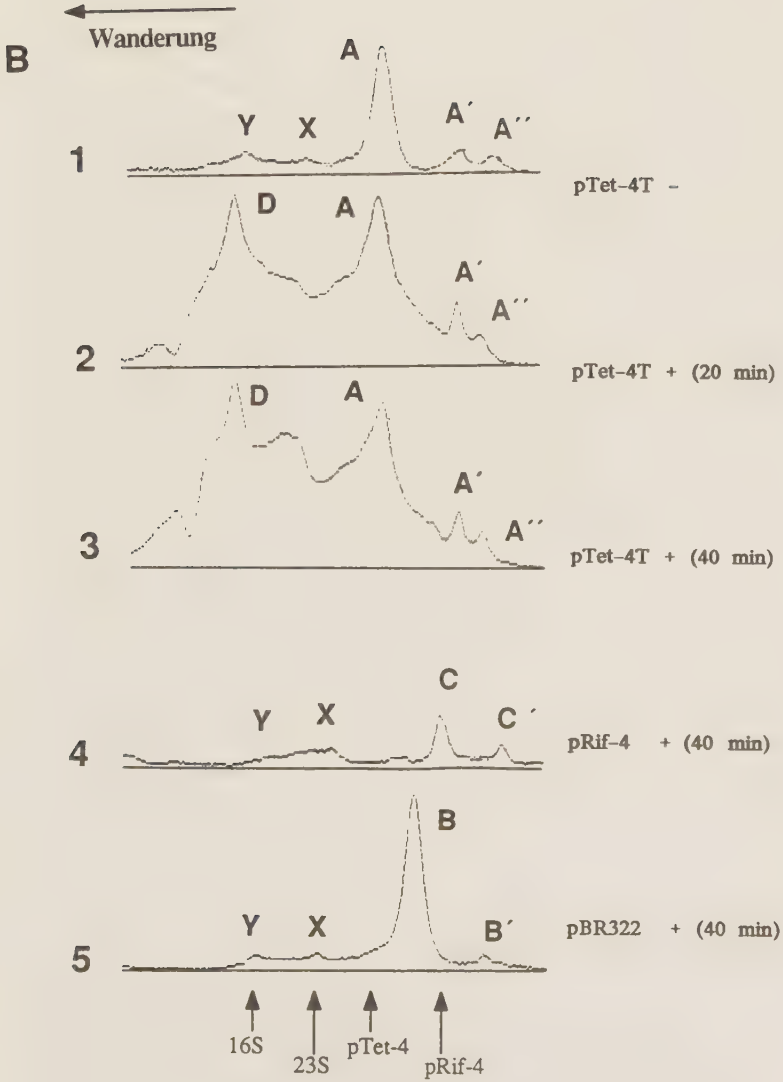


Fig. 43B:

Proteinbiosynthese in *E. coli* K38/pGP1-2 Bakterien transformiert (vgl. Meth., 6.7.).

Die RNA-Synthese *in vivo* wurde zuerst an T7 Promotor-Plasmiden mit dem Tet-Gen (Fig. 17) untersucht. Diese Plasmide enthalten ein 1,4 kb langes *Hind*III/*Ava*I Fragment aus pBR322 mit dem gesamten kodierenden Bereich des Tet-Gens, dessen Genprodukt Resistenz gegen Tetracyclin vermittelt (Backman und Boyer, 1983), aber ohne funktionsfähigen Promotor (West und Rodriguez, 1982). Die Orientierung des Tet-Gens auf pTet-4 ist so, daß am T7 Promotor Phi 10 eine für das Tet-Protein kodierende RNA synthetisiert wird (Fig. 17). Die Transkription des Tet-Gens sollte daher ausschließlich durch die T7 RNA-Polymerase möglich sein.

Bereits in Kapitel 1.1. (Fig. 26) konnte gezeigt werden, daß der Terminator T auf pTet-4T bei einer *in vitro* Transkription partiell wirksam ist. Nun sollte durch Northern-Hybridisierung untersucht werden, ob auch *in vivo* eine an T entstehende Terminations-RNA gefunden wird.

Dazu wurde ein Extrakt von *E. coli* K38/pGP1-2 (vgl. Meth., 7.1.) mit pTet-4T ohne Induktion (Fig. 43A, Spur 3), sowie 20 min (Spur 4) und 40 min (Spur 5) nach Beginn der Induktion elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. Meth., 5.3.). Die Inkubation der nicht induzierten Bakterien geschah ohne Rifampicin bei 30°C. Bei induzierten Bakterien erfolgte dagegen eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 42°C zur Expression des T7 RNA-Polymerase Gens. Nach 15 Minuten erfolgte bei diesen Ansätzen eine Zugabe von Rifampicin, um die Transkription durch *E. coli* RNA-Polymerase auszuschalten (vgl. Meth., 9.2.). Als Kontrollen wurden zusätzlich induzierte K38/pGP1-2 Zellen mit pRif-4 (Spur 6) - ohne Tet-Gen - und pBR322 (Spur 7) - ohne T7 Promotor - untersucht. Parallel dazu erfolgte auch eine Bestimmung der Mobilität der Plasmide pRif-4 (Spur 1) und pTet-4T (Spur 2) .

Auf den Bahnen mit den Zellextrakten (3 bis 7) ist jeweils eine diffuse Spur zu beobachten, die zwei intensive Banden enthält. Die diffuse Spur besteht aus zellulärer *E. coli* mRNA. Bei den Banden handelt es sich - wie u.a. bei Studier und Moffat (1986) beschrieben - um die 23S und 16S rRNA-Spezies mit 2904 bzw. 1542 nt. Länge (Brosius *et al.*, 1981).

Die Nukleinsäuren der Spuren 3 bis 7 wurden auf eine Nylon-Membran transferiert.

Als radioaktive Probe für die Hybridisierungsreaktion (Meth., 8.3.) wurde das mit [α - 32 P] dCTP nick-translatierte 1,4 kb lange *EcoRI/HindIII* Fragment mit Tet-Gen und Polylinker aus pTet-4 (Fig. 17) verwendet.

Auf dem Autoradiogramm des Northern-Blots findet man bei pTet-4T ohne Induktion (Fig. 43B, Spur 1), eine intensive Bande A mit derselben Mobilität wie das Plasmid pTet-4T. Mit geringerer Mobilität sind zwei schwache Banden A' und A'' zu beobachten. Genau auf Höhe der 23S und 16S rRNA wandern zwei weitere wenig intensive Banden X und Y.

Die beiden Spuren mit induziertem pTet-4T (Fig. 43B, 2 und 3) sind untereinander gleich. Man findet auf ihnen die Banden A, A' und A'' mit höherer Intensität als ohne Induktion (Spur 1). Zusätzlich ist hier eine recht intensive "Schmierspur" zu erkennen, die von oberhalb A bis unterhalb der 16S rRNA reicht. Nur wenig unterhalb der 16S rRNA ist innerhalb dieser "Schmierspur" eine Bande D zu sehen.

Bei induzierten Zellen mit pBR322 (Spur 5) sieht man eine intensive Bande B mit geringerer Mobilität als A und darüber eine schwächere Bande B'. Auf Höhe der 23S und der 16S rRNA finden sich auch hier zwei schwache Banden X und Y.

Bei induzierten Bakterien mit pRif-4 (Spur 4) sieht man eine wenig intensive Bande C mit der Mobilität von pRif-4. Oberhalb davon ist eine weitere, noch schwächere Bande C' zu sehen und auf Höhe der 23S und der 16S rRNA findet man wieder die Banden X und Y.

Die Interpretation dieser Befunde beginnt mit den Banden A (Spuren 1 bis 3), B (Spur 5) und C (Spur 4). Da A und C wie die Plasmide pTet-4T bzw. pRif-4 wandern, muß es sich bei ihnen um Hybridisierungssignale gegen Plasmid-DNA handeln. Ein Transfer von Plasmid-DNA auf die Membran ohne Denaturierungsschritt wie bei einem Southern-Blot (Maniatis *et al.*, 1982) sollte möglich sein, weil die DNA nach Elektrophorese in einem Agarose-Harnstoff-Gel (vgl. Meth., 5.3.) bereits in denaturierter Form vorliegt.

Die Bande B (Fig. 43B, Spur 5) bei pBR322 wandert zwischen A und C. Da pBR322 mit 4,35 kb (Sutcliffe, 1979) auch der Größe nach zwischen pTet-4T mit 3,8 kb (2,4 kb von pT7-4 und 1,4 kb vom Tet-Fragment) und pRif-4 mit 4,6 kb (2,4 kb von pT7-4 und 2,2 kb vom 3d^{rst} Fragment) liegt, sollte B von pBR322 Plasmid-DNA stammen.

Die wenig intensiven Banden A' und A'', B' und C' wandern langsamer als die von Plasmid-DNA stammenden Banden A, B und C. Da aber ihre

Mobilität immer genau mit der Größe des jeweiligen Plasmids (pTet-4T, pBR322, pRif-4) korreliert, sollte es sich auch bei diesen Banden um Signale von Plasmid-DNA handeln, die von konkatemeren Plasmid-Formen stammen müssen.

Die unterschiedliche Intensität der Banden A, B und C resultiert aus einer unterschiedlich starken Hybridisierung der verschiedenen Plasmide gegen die radioaktive Probe. A und B sind Signale der Plasmide pTet-4T und pBR322, auf denen sich das Tet-Gen befindet und die einen 1,4 kb langen, mit der radioaktiven Probe identischen Sequenzbereich besitzen. Deshalb ist bei diesen Plasmiden ein sehr starkes Hybridisierungssignal zu erwarten, das im Experiment auch gefunden wurde (vgl. Fig. 43B). Der Grund für das wesentlich schwächere Signal bei C resultiert aus dem nur sehr kurzen, mit der radioaktiven Probe aus pTet-4 übereinstimmenden Sequenzbereich auf pRif-4, dem Polylinkerbereich.

Die Banden X und Y entstehen vermutlich durch schwache Kreuz-Hybridisierung der radioaktiven Probe mit den in besonders großer Menge vorhandenen 16S und 23S rRNA-Spezies.

Da die Bande D und die "Schmierspur" bei pTet-4T (Fig. 43B, Spuren 2 und 3) ohne Induktion völlig fehlen, muß alleine der Induktionsschritt für ihr Auftreten verantwortlich sein. Da bei Induktion die Transkription durch T7 RNA-Polymerase stimuliert wird, muß es sich bei der Bande D und der "Schmierspur" um Tet-mRNA handeln. Bedingt durch die Hemmung der Transkription durch *E. coli* RNA-Polymerase nach dem Induktionsschritt (Zugabe von Rifampicin) muß die Synthese dieser Tet-mRNA durch die T7 RNA-Polymerase geschehen.

Die Abwesenheit von Tet-mRNA bei induzierten Bakterien mit pBR322 und pRif-4 (vgl. Fig. 43B, Spuren 4 und 5) muß auf das Fehlen des T7 Promotors bei pBR322 und des Tet-Gens bei pRif-4 zurückzuführen sein. Bei der diffusen RNA-Spur handelt es sich - entsprechend den *in vitro* Versuchen - um Transkripte ohne definiertes 3'-Ende, deren Entstehen auch bei Experimenten mit einem anderen T7 Expressionssystem gezeigt wurde (Studier und Moffat, 1986).

Das Erscheinen der Bande D innerhalb der diffusen RNA-Spur ist auf das Vorhandensein einer RNA-Spezies mit definiertem 3'-Ende zurückzuführen. Ein definiertes 3'-Ende bei einer mRNA *in vivo* kann durch die Anwesenheit eines Terminationssignals auf der Matrize hervorgerufen werden.

Durch Interpolation wurde die Länge dieses Transkripts D mit 1450 - 1500 nt. bestimmt. Nun weist auch ein *in vitro* bei pTet-4T am Terminator T entstehendes Transkript eine Länge von ca. 1450 nt. auf (vgl. Fig. 26). Diese Übereinstimmung der Terminations-RNA *in vitro* mit der beobachteten Länge von D *in vivo* erlaubt den Schluß, daß D durch Termination hinter der Tet-Insertion im Bereich des Terminators T entsteht.

Die Termination ist *in vivo*, wie auch *in vitro* (vgl. Fig. 26) nur partiell effizient, da auch oberhalb von D noch Signale, die von Tet-mRNA stammen, zu sehen sind.

Um zu zeigen, daß das Auftreten eines Transkripts mit definiertem 3'-Ende durch die Anwesenheit des Terminators T bedingt ist, wurde untersucht, ob ein solches Transkript auch bei pTet-4 (ohne den Terminator T) gefunden wird. Dazu wurden die Produkte der RNA-Synthese *in vivo* an pTet-4 in K38/pGP1-2 ohne (Fig. 44, Spur 1) und mit Induktion (Spur 2), sowie an pTet-4T in K38/pGP1-2 ohne (Spur 3) und mit Induktion (Spur 4) verglichen. Die Inkubation der nicht induzierten Bakterien erfolgte bei 30°C und ohne Zusatz von Rifampicin. Die Induktion erfolgte durch Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 42°C und Zugabe von Rifampicin (vgl. Meth., 9.2.).

Bei diesem Experiment wurde angereicherte und gereinigte RNA (vgl. Meth., 7.2.) nach elektrophoretischer Auftrennung (Meth., 5.3.) auf eine Nylonmembran transferiert und gegen eine nick-translatierte Probe des Tet-Gens hybridisiert (Meth., 8.3.).

Auf allen Spuren wurden Banden mit gleicher Mobilität wie A und A' aus dem vorherigen Experiment gefunden (vgl. Fig. 43B). Diese Banden sollten - wie bereits diskutiert - durch Hybridisierung der radioaktiven Probe gegen Plasmid-DNA entstehen.

Neben diesen Banden ist ohne Induktion eine vergleichsweise wenig intensive diffuse RNA-Spur bei pTet-4 (Fig. 44, Spur 1) und pTet-4T (Spur 3) zu beobachten. Es sollte sich dabei um Tet-mRNA ohne definiertes 3'-Ende handeln, die offenbar in geringer Konzentration bereits ohne den Induktionsschritt entsteht.

Bei Induktion nimmt die Intensität der diffusen RNA-Spur sehr stark zu. Bei pTet-4T (Spur 4) ist innerhalb der Spur eine RNA-Spezies mit

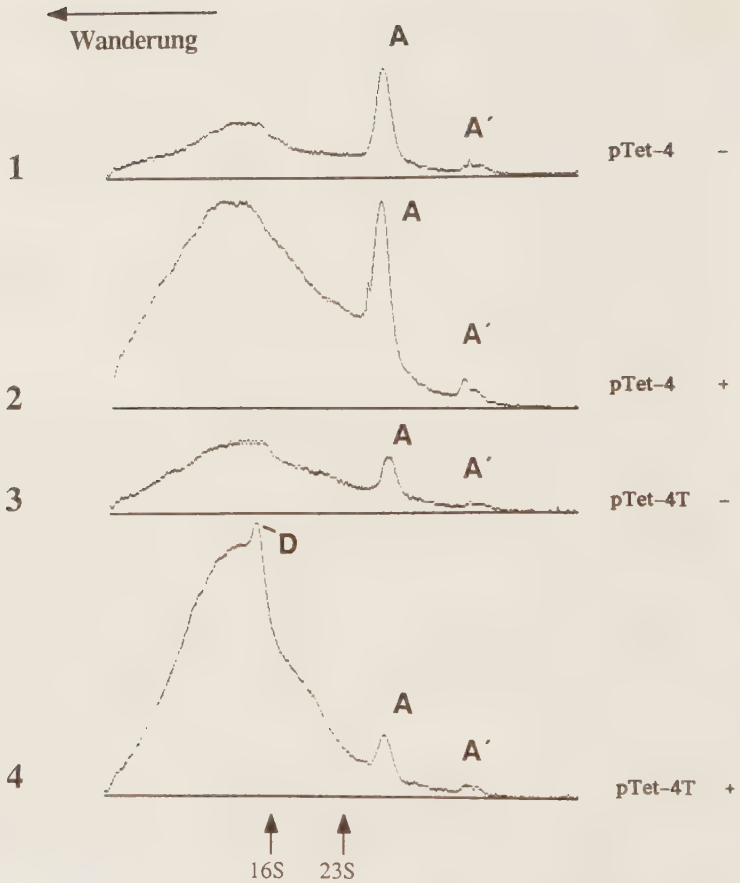


Fig. 44: Northern-Hybridisierung gegen angereicherte zelluläre RNA aus pTet-4 und pTet-4T

Als radioaktive Probe wurde das mit [α - 32 P] dCTP nick-translatierte Tet-Fragment verwendet. Die Synthese von Tet-mRNA RNA wurde in K38/pGP1-2 Bakterien ohne (-) und mit (+) Induktion untersucht. Die Banden A und A' stammen von Plasmid-DNA (pTet-4 bzw. pTet-4T). Die diffuse RNA-Spur auf allen Bahnen stammt von Tet-mRNA. Nur bei Bahn 4 (auf dem originalen Autoradiogramm besser zu erkennen als auf der densitometrischen Aufnahme) ist innerhalb dieser diffusen Spur eine Bande D zu erkennen, bei der es sich um die am Terminator T entstehende Terminations-RNA handelt. Bei der densitometrischen Auswertung wurde auf allen Spuren ein gleicher Standard (entsprechend 100%) verwendet.

definiertem 3'-Ende und derselben Mobilität wie D in Fig. 43B zu erkennen. Diese Bande fehlt hingegen bei pTet-4 (Spur 2). Dies ist auf dem Original-Autoradiogramm deutlicher zu erkennen als auf dem Densitogramm, da die Intensität der diffusen Tet-mRNA Spur gerade im Bereich der Bande D sehr hoch ist (vgl. Fig. 44).

Das Auftreten von D ist eine Folge der Anwesenheit des Terminators T auf der Matrize, da eine definierte Bande mit der Mobilität von D bei pTet-4 (ohne Terminator) nicht gefunden wird. Dies ist ein weiterer Hinweis, daß der Terminator T auch *in vivo* wirksam ist.

Die Termination an T ist nur partiell effizient, da auch oberhalb der Bande D eine Hybridisierung von Tet-mRNA gegen die Probe gefunden wird (Fig. 44, Spur 4).

In einem abschließenden Experiment dieses Kapitels wurde untersucht, ob die Termination *in vivo* auch auf pTet-6T gefunden wird. Das Plasmid pTet-6T unterscheidet sich von pTet-4T nur durch die unterschiedliche Orientierung des β -Lactamase Gens (vgl. Fig. 17).

Dazu wurde ein Rohextrakt aus K38/pGP1-2 mit pTet-6 ohne (Fig. 45, Spur 1) oder mit Induktion (Spur 2), sowie aus pTet-6T ohne (Spur 3) oder mit Induktion (Spur 4) elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. Meth., 5.3.), auf eine Nylon-Membran transferiert und gegen eine mit [α - 32 P] dCTP nick-translatierte Probe des Tet-Gens hybridisiert (Meth., 8.3.). Die Inkubation der Bakterien erfolgte wie oben und in Meth., 9.2. beschrieben. Auf allen Spuren waren Banden mit gleicher Mobilität wie A und A' zu sehen (vgl. Fig. 43B und 44), bei denen es sich um Hybridisierungssignale der radioaktiven Probe gegen Plasmid-DNA handelte.

Ohne Induktion (Fig. 45, Spuren 1 und 3) ist wieder eine diffuse RNA-Spur mit geringer Intensität zu sehen. Bei Induktion erhöht sich die Intensität dieser RNA-Spur (Spuren 2 und 4). Es sollte sich dabei - entsprechend den vorherigen Experimenten - um Tet-mRNA ohne definierte 3'-Enden handeln. Bei pTet-6T (Spur 4), aber nicht bei pTet-6 (Spur 2) ist innerhalb der "Schmierspur" eine Bande D' zu sehen, die von einer Tet-mRNA Spezies mit definiertem 3'-Ende stammt. Die Länge von D' beträgt nach Interpolation 1450 - 1500 nt. und entspricht somit der Länge des Terminations-Transkripts D an pTet-4T.

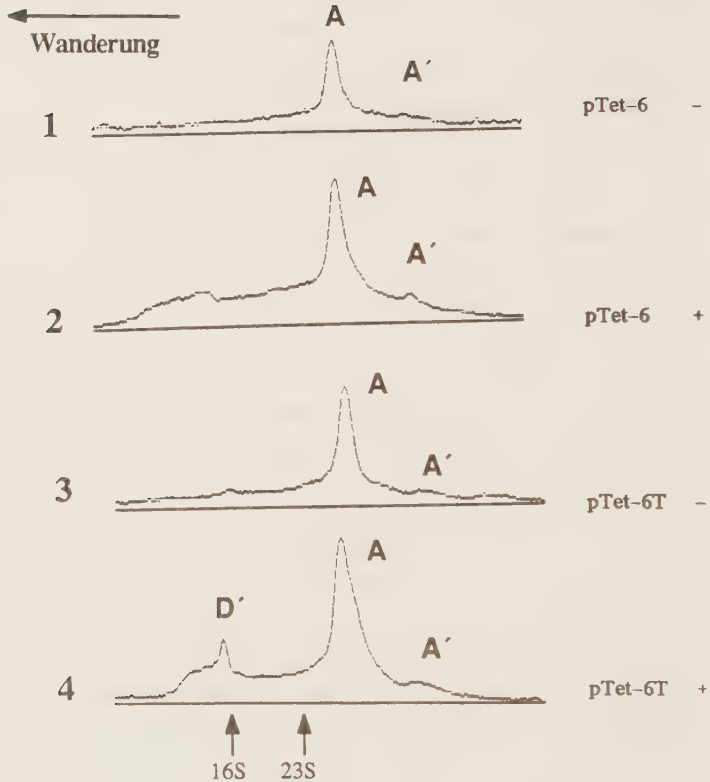


Fig. 45: Northern-Hybridisierung gegen zelluläre RNA aus pTet-6 und pTet-6T

Als radioaktive Probe wurde das mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP nick-translatierte Tet-Fragment verwendet. Die Synthese von Tet-mRNA wurde in K38/pGP1-2 Bakterien ohne (-) und mit (+) Induktion untersucht. Die Banden A und A' stammen von Plasmid-DNA (pTet-6 bzw. pTet-6T). Die diffuse Spur auf Bahn 2 und 4 stammt von Tet-mRNA. Innerhalb dieser Spur ist eine Bande D' zu erkennen, bei der es sich um die am Terminator T entstehende Terminations-RNA handelt. Bei der densitometrischen Auswertung wurde auf allen Spuren ein gleicher Standard (entsprechend 100%) verwendet.

Die an pTet-4T *in vitro* (Fig. 26) und *in vivo* (Fig. 43 und 44) beobachtete Synthese einer 1500 nt. langen RNA abhängig von der Anwesenheit des Terminators T hinter dem Tet-Gen kann an pTet-6T bestätigt werden. Der Terminator T ist auf pTet-4T und pTet-6T bei der RNA-Synthese *in vivo* partiell wirksam.

2.2. RNA-Synthese an T7-Plasmiden mit dem 3d^{r1f} Gen

In diesem Kapitel sollte untersucht werden, ob das synthetische DNA-Fragment T *in vivo* auch hinter dem 3d^{r1f} Gen als Terminator wirksam ist. Auf 3d^{r1f} befinden sich außerdem die Terminatoren Rif-TA und Rif-TB (vgl. Erg., 1.4.), die *in vitro* effizienter als T waren (vgl. Erg., 1.7.). So konnte auch untersucht werden, ob an Rif-TA und Rif-TB auch *in vivo* eine Termination stattfindet.

Dazu wurden die Plasmide pRif-4 und pRif-4T (Fig. 15) in *E. coli* K38/pGP1-2 transformiert. Ein Zellextrakt aus Bakterien mit pRif-4 ohne (Fig. 46, Spur 1) oder mit Induktion (Spur 2), sowie mit pRif-4T ohne (Spur 3) oder mit Induktion pRif-4T (Spur 4) wurde elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. Meth., 5.3.), auf eine Nylonmembran transferiert und gegen die 2,1 kb lange, mit [α -³²P] dCTP nick-translatierte 3d^{r1f} EcoRI/PstI Insertion aus pRif-4 hybridisiert (Meth., 8.3.). Die Induktion erfolgte wie in Erg., 2.1. und Meth., 9.2. beschrieben durch Erhöhung der Inkubationstemperatur von 30°C auf 42°C und Zugabe von Rifampicin.

Bei pRif-4 ohne Induktion (Spur 1) ist eine intensive Bande C zu erkennen. Nach der Mobilität von C handelt es sich dabei um das bereits bekannte Hybridisierungssignal der Plasmid-DNA von pRif-4 gegen die radioaktive Probe (vgl. Fig. 43 B). Langsamer als C wandern zwei weniger intensive Banden C' und C''. Diese Banden sollten - wie bei den Tet-Plasmiden - von anderen (eventuell konkatemeren) Formen des Plasmids pRif-4 stammen.

Weiterhin ist eine wenig intensive "Schmierspür" zu sehen, die sich von der 16S rRNA bis zur Bande C' erstreckt. Dabei muß es sich (vgl. Erg., 2.1. beim Tet-Gen) um 3d^{r1f}-mRNA ohne definierte 3'-Enden handeln.

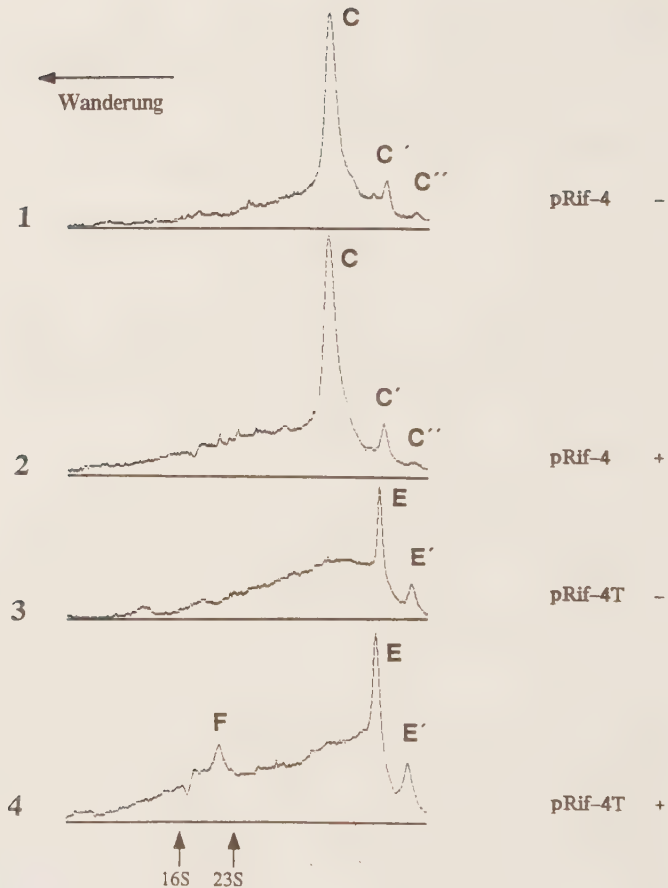


Fig. 46: Northern-Hybridisierung gegen zelluläre RNA aus pRif-4 und pRif-4T

Als radioaktive Probe wurde das mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP nick-translatierte Rif-Fragment verwendet. Die Synthese von 3d^{rif} -mRNA wurde in K38/pGP1-2 Bakterien ohne (-) und mit (+) Induktion untersucht. Die Banden C, C', C'', E und E' stammen von Plasmid-DNA (pRif-4 bzw. pRif-4T). Die diffuse Spur auf allen Bahnen stammt von 3d^{rif} -mRNA. Auf Bahn 4 ist zusätzlich eine Bande F zu erkennen, bei der es sich um die am Terminator T entstehende Terminations-RNA handelt. Bei der densitometrischen Auswertung wurde auf allen Spuren ein gleicher Standard (entsprechend 100%) verwendet.

Bei pRif-4 mit Induktion (Fig. 46, Spur 2) sind ebenfalls die Banden C, C' und C'' zu beobachten. Daneben sieht man eine diffuse Spur von 3d^{rif}-RNA, die etwas - aber nicht wesentlich - intensiver ist als ohne Induktion (Spur 1).

Bei pRif-4T ohne Induktion (Spur 3) sind zwei Banden E und E' zu sehen, von denen E - die intensivere - wie C' und E' wie C'' wandert. Die Bande E sollte - entsprechend C (Spuren 1 und 2) - durch Hybridisierung der Plasmid-DNA von pRif-4T gegen die Probe entstehen.

Die geringere Mobilität von E (pRif-4T) gegenüber C (pRif-4) entspricht auch der Wanderung beider Plasmide in einem Agarose-Gel (vgl. Fig. 16) und ist auf die konkatemere Form von pRif-4T zurückzuführen.

Auch bei pRif-4T ohne Induktion (Spur 3) ist eine diffuse RNA-Spur zu sehen, die von der Bande E bis zur 16S rRNA reicht.

Bei pRif-4T mit Induktion (Spur 4) sind ebenfalls E und E' zu erkennen. Es tritt auch eine diffuse Spur von 3d^{rif}-RNA auf, die etwas - aber nicht viel - intensiver ist als ohne Induktion (Spur 3). Innerhalb dieser Spur erkennt man eine Bande F, die von einer RNA-Spezies mit definiertem 3'-Ende stammen muß. Durch Interpolation wurde die Länge von F mit 2200 - 2300 nt. bestimmt.

Nun sollte ein Transkript an pRif-4T, das vom T7 Promotor Phi 10 bis zum Terminator T reicht, ebenfalls 2200 nt. lang sein, da die Größe der 3d^{rif} Insertion 2,15 kb beträgt (vgl. Fig. 15). Deshalb muß das Auftreten von F eine Folge der Anwesenheit des Terminators T sein, da an pRif-4 kein entsprechendes Transkript gefunden wird. Der Terminator T ist offenbar *in vivo* auch auf pRif-4T wirksam.

Auf dem Densitogramm sind keine RNA-Spezies von 115 bzw. 390 nt. Länge zu erkennen, wie sie durch Termination an Rif-TB oder Rif-TA entstehen sollten. Dies könnte bedeuten, daß beide Terminatoren *in vivo* nicht wirksam sind.

Es ist bemerkenswert, daß bei pRif-4 und besonders bei pRif-4T bereits ohne Induktion eine deutliche Hybridisierung von RNA-Molekülen gegen die 3d^{rif}-Probe gefunden wird (Fig. 46, Spuren 1 und 3). Außerdem findet die Verstärkung des Hybridisierungssignals von 3d^{rif}-mRNA bei Induktion nur in vergleichsweise geringem Umfang statt (vgl. Fig. 46, 1 und 2 bzw. 3 und 4). Es stellt sich die Frage, wodurch diese - gegenüber der Tet-mRNA (vgl. z.B. Fig. 43B) - nur geringe Änderung der Transkript-Konzentration bei Induktion hervorgerufen wird und ob dieses Phänomen

die Biosynthese der auf 3d^{r1f} kodierenden Proteine beeinflusst. Auf diese Fragestellung wird später in den Kapiteln 3.1. und 3.3. eingegangen.

2.3. RNA-Synthese an T7 Plasmiden mit dem Cat-Gen

In den Kapiteln 2.1 und 2.2. konnte gezeigt werden, daß der Terminator T bei Transkription durch T7 RNA-Polymerase *in vivo* wirksam ist. Dabei enthält T nur 50 bp des T7 Genoms (24164 bis 24214) aus dem Bereich des T7 Terminators TPhi (vgl. Erg. 1.1.). Nun sollte geprüft werden, ob auch andere *in vitro* gefundene Terminationssequenzen *in vivo* wirksam sind. Für dieses Experiment wurden die Terminatoren S1 und S2 - mit einer im Vergleich zu T oder TPhi modifizierten Nukleotidsequenz (vgl. Erg., 1.1.) - und der Terminator *rrnB*-T1 - mit einer von TPhi völlig verschiedenen Nukleotidsequenz (vgl. Erg., 1.3.) - neben T und TPhi (auf dem T7 Fragment *HinP* C, vgl. Erg., 1.2.) untersucht.

Es konnte bereits bei einer *in vitro* Transkription gezeigt werden (vgl. Fig. 42), daß diese Terminatoren in T7 Vektoren hinter dem Cat-Gen wirksam sind. Nun sollte durch Northern-Hybridisierung - wie in Kap. 2.1. und 2.2. beschrieben - untersucht werden, ob auch *in vivo* Terminations-Transkripte beobachtet werden können.

Dazu wurde der Rohextrakt (Meth., 7.1.) aus K38/pGP1-2 mit Cat-Plasmiden ohne bzw. mit Induktion (vgl. Meth., 9.2.) elektrophoretisch aufgetrennt (Meth., 5.3.), auf eine Nylonmembran transferiert und gegen die mit [α -³²P] dCTP nick-translatierte *Bam*HI/*Hind*III Cat-Insertion aus pCat-4 hybridisiert (Meth., 8.3.).

Auf allen Spuren des Autoradiogramms treten Banden G, G' und G'' mit geringerer Mobilität als die 23S rRNA auf (Fig. 47). Bei diesen Banden muß es sich - wie bei den Tet-Plasmiden (vgl. Erg., 2.1.) und bei den Rif-Plasmiden (vgl. Erg., 2.2.) - um Hybridisierungssignale von Plasmid-DNA gegen die radioaktive Probe handeln.

Ohne Induktion waren ansonsten keine Banden zu erkennen (Fig. 47, Spuren 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 und 15). Dagegen war mit Induktion auf allen Bahnen eine sehr intensive RNA-Spur zu sehen (Fig. 47, Spuren 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 und 16).

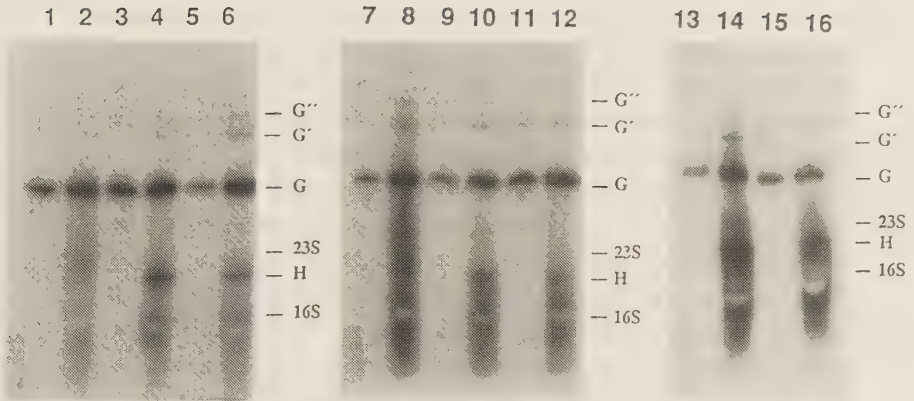


Fig. 47: Northern-Hybridisierung gegen zelluläre RNA aus Cat-Plasmiden

Als radioaktive Probe wurde das mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP nick-translatierte Cat-Fragment verwendet. Die Synthese von Cat-mRNA wurde in K38/pGP1-2 Bakterien ohne (-) und mit (+) Induktion untersucht.

Die Banden 'G', G' und G'' stammen von Plasmid-DNA. Die diffuse RNA-Spur auf den Bahnen mit Induktion stammt von Cat-mRNA.

Innerhalb dieser Spur ist auf Bahn 4, 6, 10, 12, 14 und 16 eine Terminations-RNA H zu erkennen.

1: pCat-4	-	2: pCat-4	+
3: pCat-4T	-	4: pCat-4T	+
5: pCat-4S1	-	6: pCat-4S1	+
7: pCat-6	-	8: pCat-6	+
9: pCat-6T	-	10: pCat-6T	+
11: pCat-6Phi	-	12: pCat-6Phi	+
13: pCat-4S2	-	14: pCat-4S2	+
15: pCat-6R	-	16: pCat-6R	+

Diese diffuse RNA-Spur sollte - wie bei den Tet-Plasmiden (vgl. Erg., 2.1.) und bei den Rif-Plasmiden (vgl. Erg., 2.2.) - von Cat-mRNA-Molekülen ohne definiertes 3'-Ende stammen. Die RNA-Spur erstreckt sich über die gesamte Membran, wobei ihre Intensität unterhalb der Plasmid-Bande F am höchsten wird.

Bei pCat-4 (Spur 2) und pCat-6 (Spur 8) - den beiden Plasmiden ohne Terminator - ist innerhalb dieser Spur keine Bande zu erkennen.

Dagegen ist bei allen anderen Plasmiden - mit Terminator - innerhalb der RNA-Spur eine Bande H zu erkennen, die zwischen den Banden der 23S und der 16S rRNA wandert (Spuren 4, 6, 10, 12, 14 und 16). Die Länge von H wurde durch Interpolation mit 1800 - 1900 nt. bestimmt.

Die Länge der Cat-Insertion beträgt 1700 nt. (vgl. Fig. 19) und die Terminatoren befinden sich direkt am Ende von Cat. Somit müssen an die ihnen entstehenden Terminations-Transkripte 1800 bis 1850 nt. lang sein (vgl. Erg., 1.7.). Dies stimmt auch mit der beobachteten Länge von H überein.

Da auch das Auftreten von H nur bei Anwesenheit eines Terminators erfolgt, muß das Transkript H durch Termination an den DNA-Fragmenten hinter dem Cat-Gen entstehen.

Es wird deutlich, daß neben TPhi und T, auch die Terminatoren S1, S2, und *rmb*-T1 (in pCat-6R) *in vivo* wirksam sind. Es konnte mit *rmb*-T1 erstmals gezeigt werden, daß auch Terminatoren, die nicht eine mit TPhi verwandte Nukleotidsequenz besitzen, *in vivo* von der T7 RNA-Polymerase erkannt werden.

Ein signifikanter Unterschied in der Effizienz der verschiedenen Terminatoren ist nicht erkennbar (vgl. Fig. 47). Es wird auf jeder Spur auch oberhalb der Terminations-RNA H eine Hybridisierung von Cat-mRNA gegen die radioaktive Probe beobachtet. Das bedeutet, daß alle untersuchten Terminatoren - auch die *in vitro* sehr effizienten S1 und *rmb*-T1 - *in vivo* nur partiell effizient sind.

3. EINFLUSS VON TERMINATOREN BEI DER GENEXPRESSION DURCH T7 RNA-POLYMERASE AUF PROTEINEBENE

3.1. Analyse der Proteinbiosynthese durch SDS-PAGE

Die Termination der T7 RNA-Polymerase wurde bereits *in vitro* (Erg. 1) und *in vivo* (Erg. 2) auf Ebene der RNA-Synthese untersucht. In diesem Abschnitt wird geprüft, ob der Einfluß des Terminators T für die T7 RNA-Polymerase auch auf Ebene der Proteinbiosynthese erkennbar ist.

Die Experimente in diesem Kapitel wurden – wie bereits die Untersuchungen zur RNA-Synthese *in vivo* – mit dem induzierbaren T7 Promotor/Polymerase System von Tabor und Richardson (1985) durchgeführt (vgl. Meth., 9.1.). Die Analyse der entstehenden Proteine erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese.

Bei Induktion des T7 Expressionssystems durch Temperaturerhöhung auf 42°C und Zugabe von Rifampicin fanden Tabor und Richardson (1985), daß ausschließlich Proteine mit [³⁵S] Methionin markiert werden, deren Gene unter Kontrolle des T7 Promotors stehen. Die Ursache für diese selektive Markierung ist eine Hemmung der *E. coli* Transkription, aber nicht der T7 Transkription durch Rifampicin.

Der erste Versuch wurde an T7 Vektoren mit der Tet-Insertion aus pBR322 (Fig. 17) durchgeführt, die als *Hind*III/*Ava*I Fragment hinter den T7 Promotor eingebaut wurde. Durch den Restriktionsschnitt mit *Hind*III (Position 29 auf pBR322) erfolgt eine partielle Deletion des natürlichen Tet-Gen Promotors (West und Rodriguez, 1982). Die ribosomale Bindungsstelle auf der Tet-mRNA (Shine und Dalgarno, 1975) 10 Basen vor dem ATG-Startkodon (Position 86 von pBR322) bleibt aber erhalten. Da Transkription durch *E. coli* RNA-Polymerase am natürlichen Tet-Promotor nicht möglich ist, sollte eine Expression des Tet-Gens auf den Tet-Plasmiden nur durch T7 Transkription erfolgen.

Durch Analyse in K38/pGP1-2 Bakterien nach Induktion und Rifampicin-Zugabe mit [³⁵S] Methionin-markierten Proteine (vgl. Meth., 9.3.) sollte untersucht werden, ob die Anwesenheit des Terminators T hinter dem Tet-Gen die Genexpression beeinflusst. Zur Kontrolle wurde auch die Protein-synthese an nicht durch Temperaturerhöhung induzierten, aber mit Rifampicin behandelten Bakterien geprüft (Meth., 9.3.).

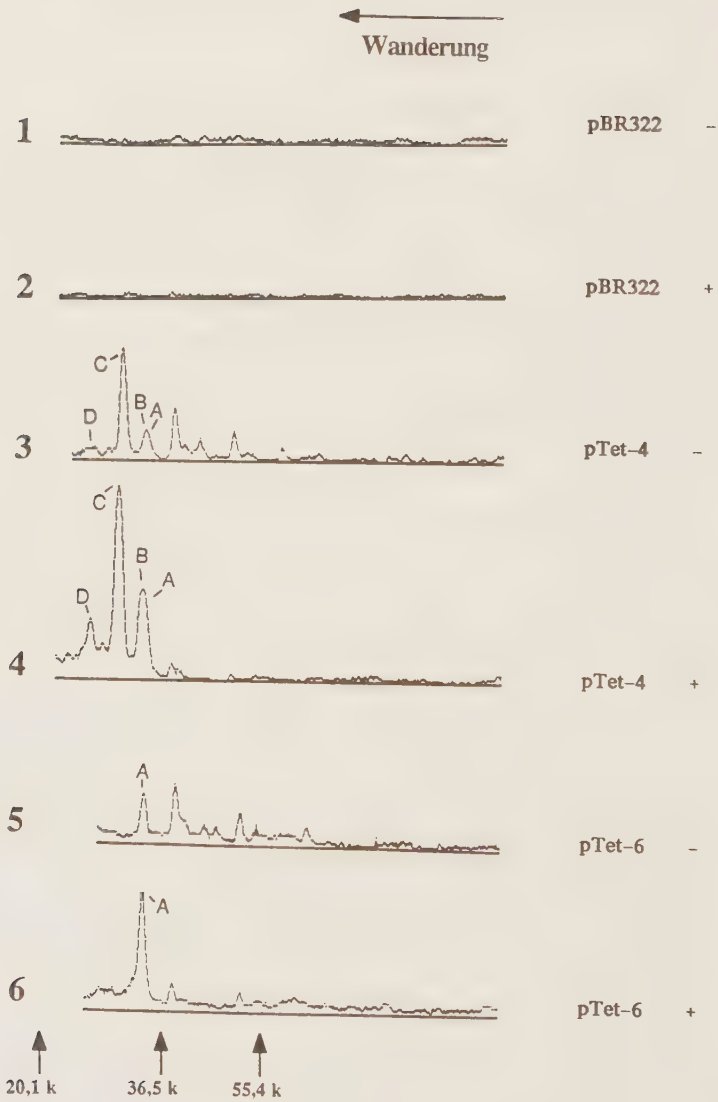


Fig. 48:

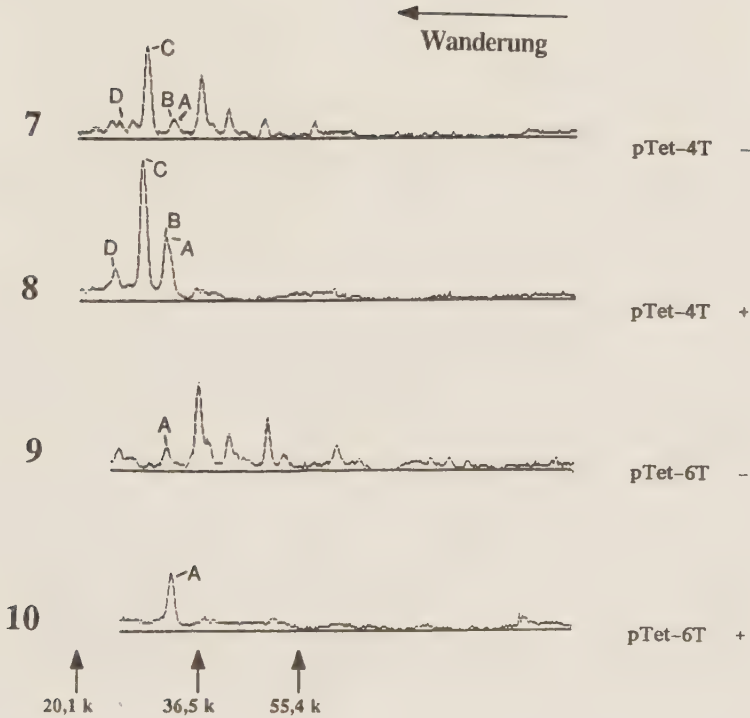


Fig. 48: Proteinsynthese bei Tet-Plasmiden

Die Synthese von mit [35 S] Methionin markierten Proteinen wurde bei Anwesenheit von Rifampicin in K38/pGP1-2 Bakterien ohne (-) und mit (+) Induktion untersucht.

Die Bande A entspricht dem Tet-Protein. Die Banden B, C und D sind Produkte des β -Lactamase Gens. Die nicht bezeichneten Banden (Spuren 3, 5, 7 und 9) sind Proteine, die durch Transkription der *E. coli* RNA-Polymerase entstehen müssen und die nicht weiter diskutiert werden. Bei der densitometrischen Auswertung wurde auf allen Spuren ein gleicher Standard (entsprechend 100%) verwendet.

Die bakteriellen Proteine wurden nach Lysis der Zellen in einem Polyacrylamid-SDS-Gel aufgetrennt (Meth., 5.5.). Als Proben wurden *E. coli* K38/pGP1-2 mit pBR322 (ein Plasmid ohne T7 Promotor), pTet-4, pTet-6, pTet-4T und pTet-6T jeweils ohne und mit Induktion verwendet.

Bei pBR322 mit Induktion (Fig. 48, Spur 2) sind keine und bei pBR322 ohne Induktion (Spur 1) nur sehr schwache Proteinbanden zu sehen.

Bei pTet-4 mit Induktion (Spur 4) sind dagegen vier intensive Banden zu beobachten, eine (nur auf dem Original auflösbare) Doppelbande A, B und mit höherer Mobilität die intensive Bande C und die schwächere Bande D. A und B wandern mit einem M_r von 32k, C mit 30k und D mit 27k.

Ohne Induktion (Spur 3) treten bei pTet-4 dieselben Banden A, B, C und D mit erheblich geringerer Intensität wie mit Induktion auf. Zusätzlich sind noch weitere Banden zu beobachten, die aber nicht diskutiert werden. Es muß sich dabei um Proteine handeln, die durch Transkription mit *E. coli* RNA-Polymerase entstehen. Ihr Auftreten kann durch die geringe Permeabilität von Zellen für Rifampicin bei 30°C (S. Tabor, pers. Mitt.) und die daraus folgende unvollständige Hemmung der *E. coli* RNA-Polymerase erklärt werden.

Bei pTet-6 mit Induktion (Spur 6) ist nur eine intensive Bande zu beobachten, die auf dem Gel wie A, die Bande mit der geringsten Mobilität auf Spur 4, wandert. Ohne Induktion (Spur 5) sind neben A wieder *E. coli* Proteine zu sehen. Wie bereits bei pTet-4 ist die Intensität von A ohne Induktion geringer ist als mit Induktion (vgl. Spur 6).

Das Fehlen von Banden bei pBR322 mit Induktion (Spur 2) bedeutet, daß bei Induktion eine Synthese von markierten Proteinen nur erfolgt, wenn ein T7 Promotor vorhanden ist. Dies bedeutet wiederum, daß alle bei Induktion der Bakterien auftretenden intensiven radioaktiv markierten Proteine aus T7 Transkripten entstehen.

Tabor und Richardson fanden (1985) bei Proteinsynthese an pT7-4 ohne Insertion (vgl. Fig. 5) drei radioaktiv markierte Banden. Dabei handelt es sich um das β -Lactamase-Vorläufer-Protein, die prozessierte β -Lactamase und um ein Segment der β -Lactamase mit M_r von 32k, 30k bzw. 28k. Da pTet-4 aus dem Vektor pT7-4 konstruiert wurde (Fig. 17), waren diese drei Banden auch bei Proteinsynthese an pTet-4 zu erwarten.

Auf dem Plasmid pTet-6 liegt hingegen das β -Lactamase Gen bezogen auf den T7 Promotor in umgekehrter Orientierung vor (Fig. 17) und kann nicht durch die T7 RNA-Polymerase exprimiert werden.

Daher muß es sich bei den Banden B, C und D, die an pTet-6 (Spur 6) im Vergleich zu pTet-4 (Spur 4) fehlen, um Produkte des β -Lactamase Gens handeln. Aufgrund ihrer Mobilität können B, C und D dem β -Lactamase-Vorläufer-Protein, der prozessierten β -Lactamase und dem translatierten β -Lactamase Segment zugeordnet werden.

Die Bande A ist bei pTet-4 und pTet-6 zu sehen. Sie besitzt auf dem SDS-Gel ein $M_{r,app}$ von 32k und könnte dem Tetracyclin-Resistenzprotein entsprechen. Allerdings kodiert das Tet-Gen auf pBR322 für ein Protein mit einer Molekularmasse von 43,5k (Backman und Boyer, 1983). Es ist aber bekannt, daß dieses Protein auf Polyacrylamid-SDS-Gelen mit 36,5k (Backman und Boyer, 1983) bzw. 34k (Tait und Boyer, 1978) erheblich schneller wandert als es seiner Molekularmasse entspricht. Deshalb dürfte die Deutung der Bande A als Tet-Protein wohl zulässig sein.

Die dem Tet-Protein entsprechende Bande A wird mit geringer Intensität bereits ohne Induktion beobachtet (Fig. 48, Spuren 3 und 5). Es muß also bereits in nicht induzierten Zellen T7 RNA-Polymerase vorhanden sein. Die Expression des T7 RNA-Polymerase Gens in K38/pGP1-2 kann nicht vollständig durch den Lambda-Repressor blockiert werden.

Bei Induktion wird eine Erhöhung der Synthese des Tet-Proteins gefunden (vgl. Fig. 48, Spuren 3 und 4, bzw. 5 und 6). Die Temperaturerhöhung auf 42°C (vgl. Meth., 9.3.) bewirkt - wie bei Tabor und Richardson (1985) beschrieben - eine verstärkte Synthese der T7 RNA-Polymerase, welche wiederum zu einer erhöhten Expression des Tet-Gens führt.

Anhand der Proteinsynthese bei K38/pGP1-2 mit pTet-4T und pTet-6T sollte nun die Wirkung des Terminators T auf die Genexpression durch die T7 RNA-Polymerase ermittelt werden.

Bei pTet-4T mit Induktion (Fig. 46, Spur 8) sind - wie bei pTet-4 (Spur 4) - vier Banden A, B, C und D zu erkennen. Die Intensitätsverteilung dieser Banden bleibt untereinander gleich, ihre Gesamtintensität ist aber geringer als bei pTet-4. Ohne Induktion treten bei pTet-4T (Spur 7) ebenfalls wieder A, B, C und D auf, ihre Intensität ist auch hier geringer als bei pTet-4 (Spur 3).

Bei pTet-6T mit Induktion (Spur 10) ist nur die Bande A des Tet-Proteins zu sehen. Auch hier findet man eine geringere Intensität von A als bei pTet-6 (Spur 6). Ebenso ist bei pTet-6T ohne Induktion (Spur 9)

die Bande A des Tet-Proteins mit geringerer Intensität als bei pTet-6 (Spur 5) zu beobachten.

Eine vollständige Effizienz des Terminators T, die zu einem Verschwinden der β -Lactamase Banden bei pTet-4T führen sollte, wurde nicht gefunden. Dies war auch aus den Ergebnissen bei der RNA-Synthese *in vivo* nicht zu erwarten (vgl. Erg., 2.1.).

Die Anwesenheit des Terminators T reduziert hingegen gleichmäßig die Expression aller auf dem T7 Promotor-Plasmid liegenden Gene (β -Lactamase und Tet). Dabei scheint es keine Rolle zu spielen, ob ein Gen 5'-stromauf (Tet) oder 3'-stromab (β -Lactamase) des Terminators liegt.

Im nächsten Versuch sollte geprüft werden, welche radioaktiv markierten Produkte bei Proteinsynthese mit den Plasmiden pRif-4, pRif-6 und pRif-4T entstehen. Eine selektive Hemmung der *E. coli* RNA-Polymerase durch 200 $\mu\text{g/mL}$ Rifampicin (Meth., 9.3.) sollte hier trotz der Anwesenheit des Rifampicin-Resistenz-Gens $3d^{rif}$ möglich sein, da $3d^{rif}$ in *E. coli* K38/pGP1-2 nur eine Resistenz gegen 15 $\mu\text{g/mL}$ Rifampicin vermittelt (Skrobranek, 1988).

Auf den Rif-Plasmiden liegt hinter dem T7 Promotor das $3d^{rif}$ Gen, auf dem sich offene Leserahmen für zwei Proteine Rif-IIb ($M_r = 48,5k$) und Rif-I ($M_r = 11,4 k$) befinden (Fig. 33). Vor diesen offenen Leserahmen befinden sich zwei *E. coli* Promotoren P I und P II, an denen eine Expression beider Proteine durch die *E. coli* RNA-Polymerase möglich ist (Fig. 33).

Bei *E. coli* K38/pGP1-2 mit pRif-4 sind nach Induktion (Temperaturerhöhung und Rifampicinzugabe, vgl. Meth., 9.3.) 5 Banden B, C, D, E und F zu sehen (Fig. 49, Spur 2). Zusätzlich tritt noch eine - nur im Original erkennbare - "Schmierspur" auf, die von E bis zur Auftragsstelle reicht.

Bei pRif-6 sind nach Induktion (Spur 4) nur die Banden E und F, sowie die "Schmierspur" zu sehen. Da bei Plasmiden, die aus pT7-6 konstruiert wurden, nur die auf einer Insertion hinter dem T7 Promotor liegende Gene exprimiert werden (vgl. Fig. 48), muß es sich bei E und F um Produkte des $3d^{rif}$ Gens handeln. Bei B, C und D mit $M_{r,app}$ von 32, 30 bzw. 27k sollte es sich um die drei bereits bekannten β -Lactamase Proteine handeln (vgl. Fig. 48).

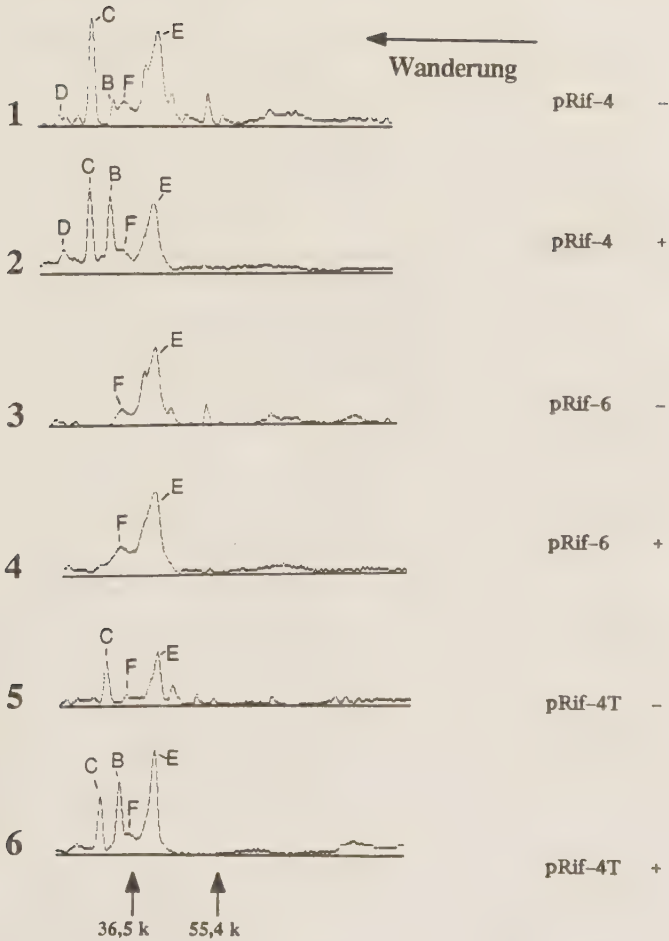


Fig. 49: Proteinsynthese bei Rif-Plasmiden

Die Synthese von mit [35 S] Methionin markierten Proteinen wurde bei Anwesenheit von Rifampicin in K38/pGP1-2 Bakterien ohne (-) und mit (+) Induktion untersucht.

Bei B, C und D handelt es sich um Produkte des β -Lactamase Gens. Die Banden E und F stammen vom Protein Rif-IIb auf dem 3d^{r1f} Gen, wobei bei sich bei F um ein Proteolyse-Produkt handeln sollte.

Bei der densitometrischen Auswertung wurde auf allen Spuren ein gleicher Standard (entsprechend 100%) verwendet.

Die Bande E besitzt nach ihrer Mobilität auf dem Gel ein $M_{r,app}$ von 42k und ist offenbar dem 48k schweren Protein I Ib auf 3d^{r1f} zuzuordnen. Die - im Vergleich zu seinem vorhergesagten Molekulargewicht - höhere Mobilität könnte auf die hydrophoben Eigenschaften dieses Proteins zurückzuführen sein (Skrobranek, 1988). Die gleiche Beobachtung wurde bereits bei dem ebenfalls hydrophoben Tet-Protein (vgl. Fig. 48) gemacht. Das Vorhandensein einer "Schmierspur" von der Auftragsstelle bis zur Bande E sollte bedeutet, daß offenbar bei der Lysis von Zellen durch Aufkochen (vgl. Meth., 5.5.) nur ein Teil des Rif-IIb Proteins solubilisiert werden kann.

Die Bande F ist diffus und besitzt ein $M_{r,app}$ von 34k. Es könnte sich bei ihr um ein Proteolyse-Produkt des Rif-IIb Proteins handeln. Eine Bande, die dem Protein Rif-I mit 11,4k zuzuordnen ist, war bei diesem Experiment nicht zu sehen.

Bei pRif-4T - mit dem Terminator T - sind nach Induktion (Spur 6) wie bei pRif-4 (Spur 2) die Banden B, C, D, E und F zu erkennen. Die relative Intensität von Rif-IIb (E) ist im Vergleich zur β -Lactamase (B und C) deutlich höher als bei pRif-4 (Spur 2).

Bei pRif-4 (Fig. 49, Spur 1), pRif-6 (Spur 3) und pRif-4T (Spur 5) ohne Induktion sind dieselben Banden wie auf den entsprechenden Spuren mit Induktion (Spuren 2, 4 und 6) zu erkennen. Daneben sind hier wie in Fig. 48 Banden von *E. coli* Proteinen zu sehen, die nicht diskutiert werden. Es fällt auf, daß die Intensität von Rif-IIb (E) bei pRif-4 und pRif-6 mit und ohne Induktion gleich bleibt (vgl. Fig. 49, Spuren 1 bis 4). Bei pRif-4T findet man dagegen bei Induktion eine Verstärkung von E (Spuren 5 und 6).

Eine Interpretation dieses Experiments erlaubt folgende Aussagen:

- Die auf dem Gel beobachtete Expression des Rif-IIb Gens muß durch die T7 und nicht durch die *E. coli* RNA-Polymerase erfolgen, weil eine selektive Markierung des Rif-IIb Proteins nach Hemmung der *E. coli* Transkription durch [³⁵S] Methionin gefunden wird.
- Das Intensitätsverhältnis des Rif-IIb Proteins (E) zur β -Lactamase (B und C) ist nach Induktion bei pRif-4T größer als bei pRif-4 (vgl. Spuren 2 und 6). Die Induktion bewirkt eine Stimulierung der Synthese von Rif-IIb und β -Lactamase nur bei pRif-4T (Spuren 5 und 6), nicht aber bei pRif-4 (Spuren 1 und 2) oder pRif-6 (Spuren 3 und 4). Diese Effekte können durch die Anwesenheit des Terminators T oder die

konkaternere Struktur des Plasmids pRif-4T (vgl. Fig. 16) hervorgerufen werden.

- Die Synthese von Rif-IIb findet bereits ohne Induktion in hohem Ausmaß - im Vergleich zum Tet-Protein (vgl. Fig. 48) - statt.

Auf den Cat-Plasmiden (Fig. 19 und Fig. 21) befindet sich das Gen für die Chloramphenicol-Acetyltransferase (Cat). Es sollte geprüft werden, ob eine Induktion der Synthese des Cat-Proteins bereits ohne radioaktive Markierung mit [³⁵S] Methionin auf einem SDS-Gel nachzuweisen ist. Dies war bei den Proteinen Rif-IIb und Tet, die auf den Rif- (Fig. 15) oder Tet-Plasmiden (Fig. 17) kodieren, nicht möglich (ohne Beleg).

Um eine maximale Expression des Cat-Gens zu erreichen, erfolgte die Induktion der Bakterien bei diesem Experiment aus einer Übernachtskultur (30°C) in einem angereicherten Vollmedium durch 25minutige Inkubation bei 42°C und Rifampicin-Zugabe. Erst nach weiterer 2stündiger Inkubation bei 37°C wurden die induzierten - zusammen mit den nicht induzierten (30°C und kein Rifampicin) - Bakterien lysiert und auf ein Polyacrylamid-SDS Gel aufgebracht (vgl. Meth., 9.4.).

Nach Induktion war bei pCat-4 (Fig. 50, Spur 3), pCat-4T (Spur 5), pCat-6 (Spur 7) und pCat-6T (Spur 9) eine intensive Bande G zu sehen, die ohne Induktion bei den gleichen Plasmiden (Spuren 2, 4, 6, 8) fehlte. Die Bande G besitzt nach ihrer Mobilität auf dem Gel ein $M_{r,app}$ von 25k. Dies entspricht auch genau der Molekularmasse der Chloramphenicol-Acetyltransferase (Shaw *et al.*, 1979; Alton und Vapnek, 1979). Es handelt sich daher bei G sehr wahrscheinlich um das Cat-Protein.

Die Intensität von G ist auf allen Spuren mit Induktion in etwa gleich hoch. Ein durch die Anwesenheit des Terminators T auf pCat-4T (Spur 5) und pCat-6T (Spur 9) bedingter deutlicher Unterschied in der Expression des Cat-Gens ist nicht erkennbar.

Bei pCat-4 (Spur 3) und pCat-4T (Spur 5) ist mit Induktion noch eine weitere Bande B mit $M_{r,app}$ von 32k zu sehen, die ohne Induktion fehlt (Spuren 2 und 4). Da B nur bei Plasmiden auftritt, die aus pT7-4 konstruiert wurden, muß B ein Produkt des β -Lactamase-Gens sein. Nach seiner Mobilität handelt es sich dabei um das β -Lactamase-Vorläufer-Protein.

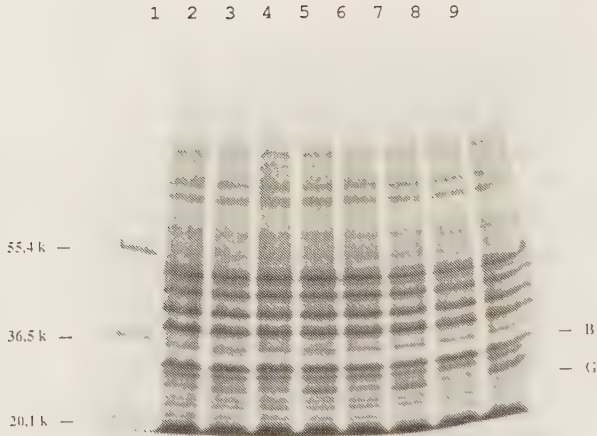


Fig. 50: Proteinsynthese bei Cat-Plasmiden ohne Markierung mit [^{35}S] Methionin

Die Synthese von Proteinen wurde bei Anwesenheit von Rifampicin in K38/pGP1-2 Bakterien ohne (-) und mit (+) Induktion untersucht. Die Anfärbung der Proteinbanden geschah durch Coomassie Blue. Außer den zellulären *E. coli* Proteinen ist auf den Spuren 3, 5, 7 und 9 (mit Induktion) eine Bande G zu sehen, die auf den Spuren ohne Induktion (2, 4, 6 und 8) fehlt. G entspricht daher der Chloramphenicol-Acetyltransferase. Direkt unterhalb des 36,5k Markerproteins ist auf den Spuren 3 und 5 (mit Induktion) die Bande B des β -Lactamase-Vorläuferproteins erkennbar, die auf den entsprechenden Spuren ohne Induktion (2 und 4) fehlt.

1: Markerproteine

2: pCat-4	-	3: pCat-4	+
4: pCat-4T	-	5: pCat-4T	+
6: pCat-6	-	7: pCat-6	+
8: pCat-6T	-	9: pCat-6T	+

Ein Versuch mit [³⁵S] Methionin Markierung sollte genaueren Aufschluß über den Einfluß verschiedener Terminatoren bei der Expression des Cat-Gens geben. Die Induktion der K38/pGP1-2 Bakterien erfolgte dabei wieder in einem Medium ohne S-Quelle (vgl. Meth., 9.3.)

Dabei wurden neben dem Terminator T auch die Terminatoren S1, S2, TPhi und *rrnB*-T1 untersucht. Als Proben wurden *E. coli* K38/pGP1-2 mit pCat-4 (Fig. 51, Spur 1), pCat-4T (Spur 2), pCat-4S1 (Spur 3), pCat-4S2 (Spur 4), pCat-6 (Spur 5), pCat-6T (Spur 6), pCat-6Phi (Spur 7) und pCat-6R (Spur 8) - alle nach einer Induktion - verwendet.

Auf allen Spuren (vgl. Fig. 51) waren zwei Banden H und I mit einem geringen Mobilitätsunterschied und $M_{r,app}$ von 26k (H) bzw. 25k (I) zu sehen. Die schnellere Bande I wandert auf gleicher Höhe mit gereinigtem Cat-Enzym aus *E. coli* und sollte deshalb mit diesem Protein identisch sein. Auch die Bande H stammt von einem T7 Transkript, da die Synthese von H nach Zugabe von Rifampicin (d.h. Hemmung der *E. coli* RNA-Polymerase) beobachtet wird. Die für H kodierende Sequenz muß sich daher auf der Cat-Insertion (bestehend aus Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen und SV40-Sequenzen) befinden. Entweder handelt es sich um einen (bislang nicht bekannten) Vorläufer des Cat-Proteins oder um das Produkt eines "zufälligen" offenen Leserahmens auf der Cat-Insertion. Eine eindeutige Zuordnung ist nicht möglich, da die genaue Basenfolge der Cat-Insertion bei Gorman *et al.* (1982) nicht publiziert wurde.

Bei pCat-4, pCat-4T, pCat-4S1 und pCat-4S2 - allen Derivaten von pT7-4 - (Fig. 51, Spuren 1 bis 4) sind neben H und I noch zwei weitere Banden B und C zu erkennen, die nach ihrer Mobilität eine Molekularmasse von 32k bzw. 30k besitzen müssen. Bei B und C sollte es sich - wie bei den Tet-Plasmiden (vgl. Fig. 48) - um Produkte des β -Lactamase Gens (Vorläufer-Protein und prozessierte β -Lactamase) handeln. Das Auftreten der β -Lactamase Banden bedeutet keine effiziente Termination an T (Spur 2), S1 (Spur 3) bzw. S2 (Spur 4), da sich auf den Cat-Plasmiden das β -Lactamase-Gen jeweils hinter den Terminatoren befindet.

Bei pCat-4, pCat-4T, pCat-4S1 und pCat-4S2 (Spuren 1 bis 4) ist ein Vergleich der Intensität des Cat-Proteins (I) zu den Genprodukten der β -Lactamase (B und C) möglich. So verringert sich bei pCat-4T (Spur 2) und noch mehr bei pCat-4S1 (Spur 3) die relative Intensität von B und C gegenüber I im Vergleich zu pCat-4 ohne Terminator (Spur 1).



Fig. 51: Proteinsynthese bei Cat-Plasmiden

Die Synthese von mit [35 S] Methionin markierten Proteinen wurde bei Anwesenheit von Rifampicin in induzierten K38/pGP1-2 Bakterien untersucht.

Bei B, C und D handelt es sich um Produkte des β -Lactamase-Gens. Die Bande I stammt vom Cat-Protein. H ist ein auf der Cat-Insertion kodierendes, aber nicht eindeutig bestimmbares Genprodukt.

Bei der denistometrischen Auswertung wurde kein Standard verwendet, deshalb ist die Höhe der Produktgipfel nur innerhalb einer Spur vergleichbar.

- | | | | |
|-----------|------------|--------------|-------------|
| 1: pCat-4 | 2: pCat-4T | 3: pCat-4S1 | 4: pCat-4S2 |
| 5: pCat-6 | 6: pCat-6T | 7: pCat-6Phi | 8: pCat-6R |

Mit allem Vorbehalt bewirkt die Anwesenheit der Terminatoren T und S1 eine gewisse Reduktion der Synthese von Cat in logarithmisch wachsenden Bakterien. Im Gegensatz dazu wird bei pCat-4S2 (Spur 4) kein Unterschied zu pCat-4 (Spur 1) gefunden.

Ein derartiger Vergleich ist bei pCat-6, pCat-6T, pCat-Phi und pCat-6R nicht möglich, da bei diesen Plasmiden die β -Lactamase Banden fehlen.

Eine genauere Bestimmung der Wirkung eines Terminators auf die Expression des Cat-Gens als durch SDS-Gelelektrophorese kann durch eine Messung der Cat-Enzymaktivität geschehen. Dieses Experiment wurde bei den Plasmiden pCat-6 und pCat-6T (mit dem Terminator T) durchgeführt und ist in Kapitel 3.4. dieser Arbeit beschrieben.

3.2. Messung der Expression des Tet-Gens über die Tetracyclin-Resistenz von Bakterien

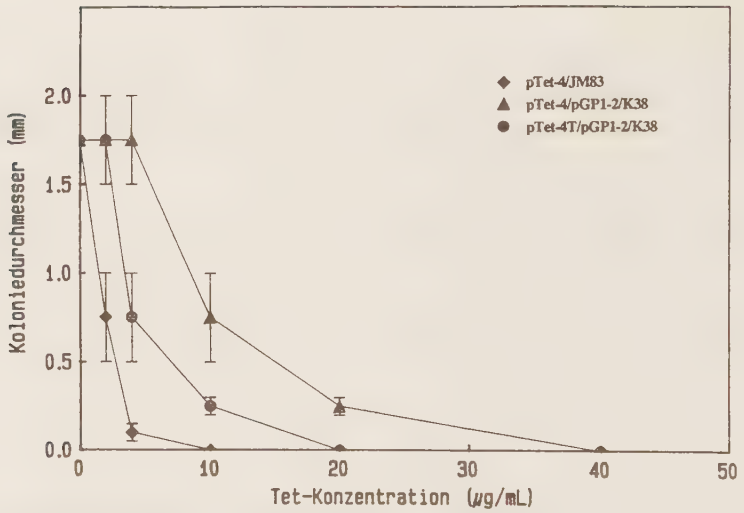
In Kapitel 3.1. konnte bereits die T7-spezifische Expression des Tet-Proteins in *E. coli* K38/pGP1-2 mit Tet-Plasmiden (Fig. 17) nachgewiesen werden. Dabei bewirkte die Anwesenheit des Terminators T hinter dem Tet-Gen eine Reduzierung der Tet-Protein-Synthese.

In diesem Kapitel sollte jetzt untersucht werden, welche Auswirkung die Expression des Tet-Gens bei Plasmiden mit und ohne Terminator auf das Zellwachstum in Gegenwart von Tetracyclin (Tc) zeigt. Im Unterschied zu Kapitel 3.1. (Nachweis durch SDS-PAGE) sollte also hier die Expression des Tet-Proteins über seine biologische Wirkung bestimmt werden.

Das Antibiotikum Tetracyclin hemmt in Bakterien die Proteinbiosynthese durch Bindung an die 30S ribosomale Untereinheit (Connamacher und Mandel, 1968). Dadurch wird die Initiation der Translation blockiert (Sarkar und Thach, 1968; Tanaka *et al.*, 1972). Eine Resistenz gegenüber Tc führt zu verringerter Konzentration des Antibiotikums in der Zelle (Backman und Boyer, 1983). Es wird angenommen (Rauschel, 1986), daß die Resistenz gegen Tc proportional zur Konzentration des Tet-Proteins in der Zelle zunimmt.

Die Tet-Insertion liegt in den Tet-Plasmiden als *Hind*III/*Ava*I Fragment unter Kontrolle eines T7 Promotors vor (Fig. 17). Der natürliche Promotor des Tet-Gens ist auf diesem Fragment durch partielle Deletion inaktiviert (West und Rodriguez, 1982).

A



B

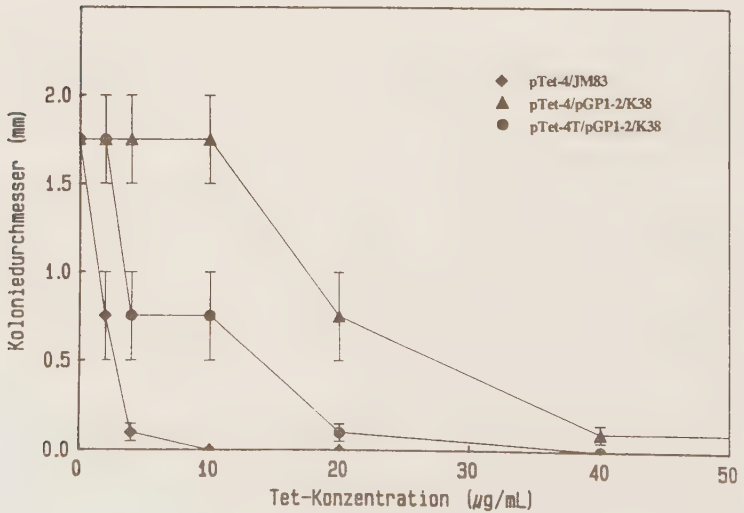


Fig. 52: Abhängigkeit des Bakterienwachstums auf Agarplatten gemessen am Koloniedurchmesser von der Tetracyclin-Konzentration

Die Inkubationsdauer betrug 20h.

A: Inkubationstemperatur 30°C

B: Inkubationstemperatur 37°C

Die Tc-Resistenz in *E. coli* K38/pGP1-2 mit einem Tet-Plasmid kann also nur durch T7 Transkription vermittelt werden. Daher sollte die RNA-Synthese am T7 Promotor direkt über die Resistenz der Bakterien gegen Tc messbar sein.

Das Wachstum von *E. coli* K38/pGP1-2 mit pTet-4, pTet-4T (Fig. 17) und von JM83 mit pTet-4 wurde auf Agar-Platten in Gegenwart von 0 bis 40 µg/mL Tc bei einer Inkubationstemperatur von 30°C und 37°C untersucht (vgl. Meth., 10.1.).

Bei unvollständiger Hemmung des Bakterienwachstums zeigte sich die Wirkung des Antibiotikums nicht in einer Reduzierung der Kolonienzahl, sondern in einer Reduzierung der Wachstumsrate. Innerhalb der vorgegebenen Inkubationsdauer (20 h) wurde eine Abnahme des mittleren Koloniedurchmessers bei steigender Tc-Konzentration gefunden. Aufgrund dieser Beobachtung wurde deshalb der mittlere Koloniedurchmesser als Maß für die Tc-Resistenz verwendet.

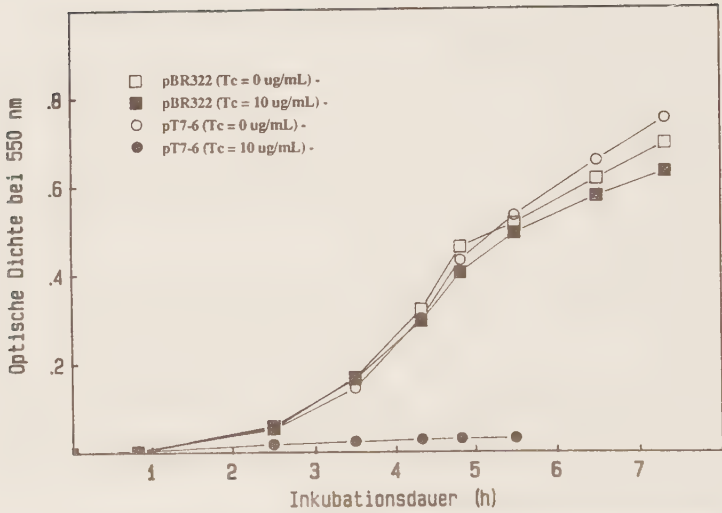
Bei JM83 Bakterien mit pTet-4 - ohne das T7 RNA-Polymerase Gen - waren bei 30°C (Fig. 52A) bzw. 37°C (Fig. 52B) keine Kolonien mit mehr als 4 µg/mL Tc zu beobachten. Diese geringe Tc-Resistenz bedeutet, daß keine nennenswerte Transkription des Tet-Gens auf pTet-4 durch *E. coli* RNA-Polymerase stattfinden kann.

Bei pTet-4 und pTet-4T in K38/pGP1-2 - mit dem T7 RNA-Polymerase Gen - wurde im Vergleich dazu eine deutlich höhere Tc-Resistenz gefunden. Bei 30°C beginnt der mittlere Durchmesser der Kolonien bei pTet-4 erst ab 10 µg/mL Tc abzunehmen, ab 40 µg/mL Tc sind keine Kolonien mehr zu beobachten (Fig. 52A). Bei pTet-4T mit dem Terminator T erfolgt dagegen eine Abnahme des Koloniedurchmessers bereits bei 4µg/mL Tc und bei 20 µg/mL Tc treten keine Kolonien mehr auf (Fig. 52A).

Diese Tc-Resistenz ist alleine durch die Anwesenheit der Tet-Plasmide und nicht durch die Verwendung von K38 statt JM83 bedingt, da K38/pGP1-2 mit dem Plasmid pT7-6 - ohne Tet-Insertion - bereits bei 10 µg/mL Tc kein Wachstum in flüssigem Medium zeigen (vgl. Fig. 53A und B).

Bei 30°C - das entspricht dem T7 System im reprimierten Zustand - ist bereits eine deutlich erhöhte Tc-Resistenz bedingt durch die Anwesenheit des Plasmids pGP1-2 mit dem T7 RNA-Polymerase Gen neben dem T7 Promotor-Plasmid zu erkennen. Dies ist ein weiterer Hinweis (vgl. Erg., 3.1.), daß im T7 Expressionssystem bereits ohne Induktion T7 RNA-Polymerase vorliegt.

A



B

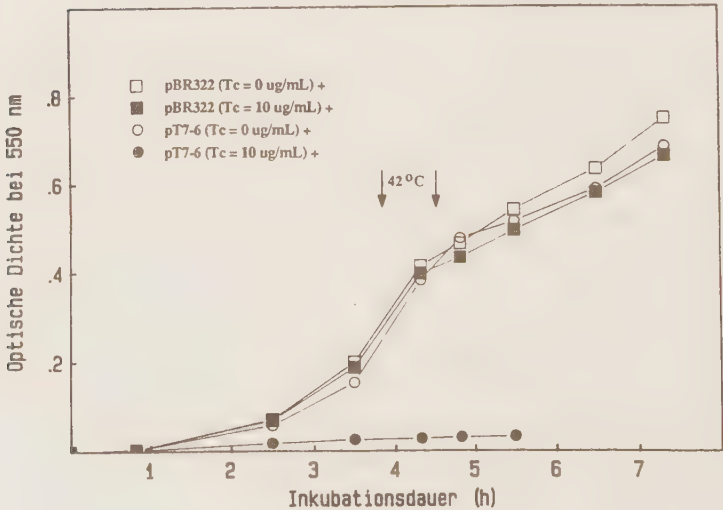
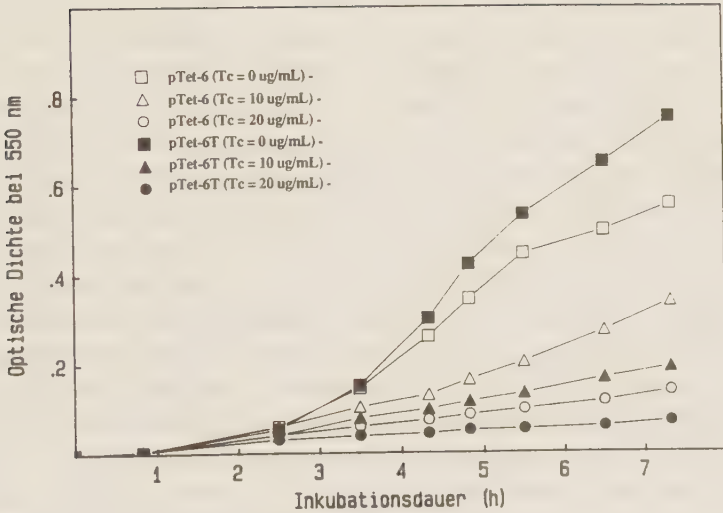


Fig. 53 (A und B): Abhängigkeit des Bakterienwachstums mit pBR322 und pT7-6 in flüssigem Medium von der Tetracyclin-Konzentration

Bei A erfolgte die Inkubation bei 30°C.

Bei B wurde nach 3 h 50 min die Inkubationstemperatur 40 min lang auf 42°C erhöht. Ansonsten betrug die Inkubationstemperatur ebenfalls 30°C.

C



D

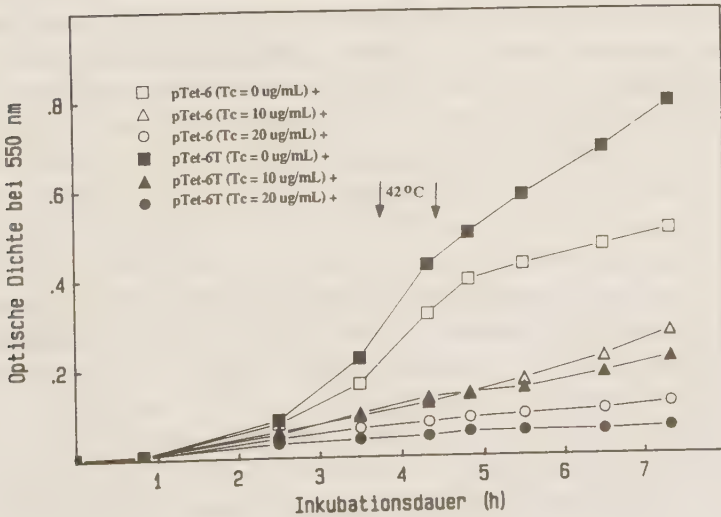


Fig. 53 (C und D): Abhängigkeit des Bakterienwachstums mit pTet-6 und pTet-6T in flüssigem Medium von der Tetracyclin-Konzentration

Bei C erfolgte die Inkubation bei 30°C.

Bei D wurde nach 3 h 50 min die Inkubationstemperatur 40 min lang auf 42°C erhöht. Ansonsten betrug die Inkubationstemperatur ebenfalls 30°C.

Die Anwesenheit des Terminators T bewirkt eine deutliche Verringerung der Tet-Gen Expression, so daß die maximale Tc-Konzentration, bei der noch Bakterienwachstum stattfindet, sich halbiert (Fig. 52A). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen zur Proteinexpression aus Kapitel 3.1..

Bei einer höheren Inkubationstemperatur von 37°C ist sowohl bei pTet-4 als auch bei pTet-4T in K38/pGP1-2 eine deutlich erhöhte Tc-Resistenz gegenüber 30°C festzustellen. Aber wiederum wird gefunden, daß die Resistenz bei pTet-4 ohne Terminator höher ist als bei pTet-4T mit Terminator. So findet bei pTet-4 eine Abnahme des Koloniedurchmessers erst ab 20 µg/mL Tc statt. Sogar bei 40 µg/mL Tc sind noch Kolonien zu beobachten (Fig. 52B). Dagegen findet man bei pTet-4T eine Verringerung des Koloniedurchmessers schon ab 4 µg/mL Tc. Bei 40 µg/mL Tc ist kein Bakterienwachstum mehr festzustellen (Fig. 52B).

Der allgemeine Anstieg der Tc-Resistenz in K38/pGP1-2 mit Tet-Plasmiden bei 37°C bedeutet eine höhere Aktivität der T7 RNA-Polymerase als bei 30°C. Die 20stündige Inkubation der Bakterien bei 37°C entspricht offenbar in gewissem Sinne einer Induktion des T7 Expressionssystems. Die beobachtete Reduzierung der Genexpression durch die Anwesenheit des Terminators T unter diesen Bedingungen (vgl. fig. 52 B) steht im Einklang mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.1. beim Nachweis des Tet-Proteins durch SDS-Gelelektrophorese.

Dieser Befund sollte jetzt durch Messung der Resistenz gegen Tetracyclin beim Wachstum von Bakterien in flüssigem Medium überprüft werden. Insbesondere sollte untersucht werden, welchen Einfluß ein 40minütiger Induktionsschritt durch Temperaturerhöhung auf 42°C (vgl. Meth., 10.2.) auf die Wachstumsrate der Zellen besitzt.

Es wurde dazu die Bakterienstämme *E. coli* K38/pGP1-2 mit den Plasmiden pTet-6, pTet-6T, pBR322 (ohne T7 Promotor) und pT7-6 (ohne Tet-Gen) untersucht. Die Ermittlung der Wachstumsrate ohne bzw. mit Induktion geschah durch Messung der Zelldichte bei 550 nm (vgl. Meth., 10.2.).

Dabei zeigte sich keine Hemmung des Wachstums von K38/pGP1-2 Bakterien mit pBR322 durch den Induktionsschritt und nur eine geringfügige Verlangsamung durch 20 µg/mL Tc (Fig. 53A und B). Offenbar wird durch das Tet-Gen auf pBR322 unter Kontrolle seines natürlichen Promotors eine konstitutiv hohe Resistenz gegen Tetracyclin vermittelt. So

wurde von Rauschel (1985) bei dem Plasmid pBR327 (Soberon *et al.*, 1980), einem Derivat von pBR322, eine Resistenz bis 65 µg/mL Tc gefunden.

Dagegen findet vollständige Inhibierung der Vermehrung von Bakterien mit pT7-6 (ohne Tet-Gen) bereits durch 10 µg/mL Tc statt (Fig. 53, A und B). Das Fehlen einer messbaren Tc-Resistenz bei pT7-6 beruht auf der Abwesenheit des Tet-Gens.

Bei Bakterien mit pTet-6 wird in Gegenwart von 10 bzw. 20 µg/mL Tc eine signifikant höhere Vermehrungsrate als bei Bakterien mit pTet-6T beobachtet (Fig. 53, C und D). Dagegen findet man ohne Zugabe von Tc ein geringfügig schnelleres Wachstum bei pTet-6T als bei pTet-6 ohne Terminator (Fig. 53, C und D).

Nach dem 40minütigen Induktionsschritt durch Temperaturerhöhung auf 42°C (vgl. Meth., 10.2.) wird weder bei pTet-6 noch bei pTet-6T eine Erhöhung der Tc-Resistenz gefunden.

Die Ursache für die fehlende Induzierbarkeit der Tc-Resistenz liegt vermutlich in der Wirkungsweise des Antibiotikums als Inhibitor der Proteinbiosynthese (Tanaka *et al.*, 1972) begründet. Durch die Induktion erfolgt eine starke Erhöhung der Synthese von Tet-mRNA (Fig. 43 B). Eine Translation dieser RNA wird offenbar jedoch durch das bereits in der Zelle vorhandene Tc weitgehend verhindert.

Es kann aber dennoch mit diesem Experiment eindrucksvoll bestätigt werden, daß die Tc-Resistenz vermittelt durch ein Plasmid mit dem Tet-Gen unter Kontrolle eines T7 Promotors durch Anwesenheit des Terminators T signifikant verringert wird. Der Terminator T kann offenbar die Expression des 5'-stromaufwärts von ihm liegenden Tet-Gens durch die T7 RNA-Polymerase reduzieren.

3.3. Nachweis der Expression des Proteins Rif-IIb mit spezifischen Antikörpern

Die Plasmide pRif-4, pRif-6 und pRif-4T (Fig. 15) enthalten das 3drif-Gen, auf dem sich offene Leserahmen für zwei Proteine befinden. In Kapitel 3.1. konnte gezeigt werden, daß eine Synthese des 48,5k großen Proteins Rif-IIb bei Induktion des T7 Expressionssystems von Tabor und Richardson (1985) erfolgt. Das Protein Rif-IIb wandert auf einem SDS-Gel

mit einem $M_{r,app}$ von 42k. Die Expression des Rif-IIb Gens erfolgte dabei durch T7 Transkription, da die *E. coli* Transkription durch Rifampicin gehemmt wurde. Bereits ohne Induktion war aber eine Bande von Rif-IIb zu erkennen, deren Intensität durch den Induktionsschritt bei pRif-4T, aber nicht bei pRif-4 und pRif-6 erhöht wurde (Fig. 49).

Die Überprüfung dieses Befunds erfolgte unter veränderten experimentellen Bedingungen (Induktion und Lysis der Bakterien) durch einen immunochemischen Nachweis von Rif-IIb im Zellextrakt. Auf diese Weise wird jedoch nicht alleine der Anteil von Rif-IIb, der durch T7 Transkription entsteht (wie in Kap. 3.1.), bestimmt. Da beim immunochemischen Nachweis die gesamte Menge an Rif-IIb erfasst wird, gelingt es bei diesem Experiment auch den Anteil von Rif-IIb, der durch *E. coli* Transkription entsteht, zu bestimmen.

Die Induktion der Bakterien erfolgte aus einer Übernachtskultur (30°C) in einem angereicherten Voll-Medium durch 25minutige Inkubation bei 42°C und Rifampicin-Zugabe (Meth., 9.4.).

Nach Lysis der Zellen erfolgte eine Behandlung des Zellextrakts mit einem Ionenaustauscher (Meth., 11.1.). Dadurch kann eine vollständige Solubilisierung des Rif-IIb Proteins bei der Elektrophorese in einem SDS-Gel erreicht werden (Skrobranek, 1988). Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine erfolgte ein Western-Transfer auf eine Nylon-Membran (Meth., 11.2.) und Inkubation mit Antikörpern gegen Rif-IIb (Skrobranek, 1988). Der Nachweis dieser immunologischen Reaktion erfolgte durch [125 J] Protein-A (Meth., 11.3.).

Auf diese Weise wurde die Synthese des Rif-IIb Proteins in *E. coli* K38/pGP1-2 mit pRif-4, pRif-6 und pRif-4T ohne bzw. mit Induktion untersucht (Fig. 54).

Die densitometrische Wiedergabe des Autoradiogramms zeigt auf allen Spuren eine intensive Bande A, die einem Protein mit $M_{r,app}$ von ca. 42k - der Mobilität von Rif-IIb bei Markierung mit [35 S] Methionin (vgl. Fig. 49) - entspricht. Aus Untersuchungen von Skrobranek (1988) ist bekannt, daß es sich bei dieser Bande um Rif-IIb handelt.

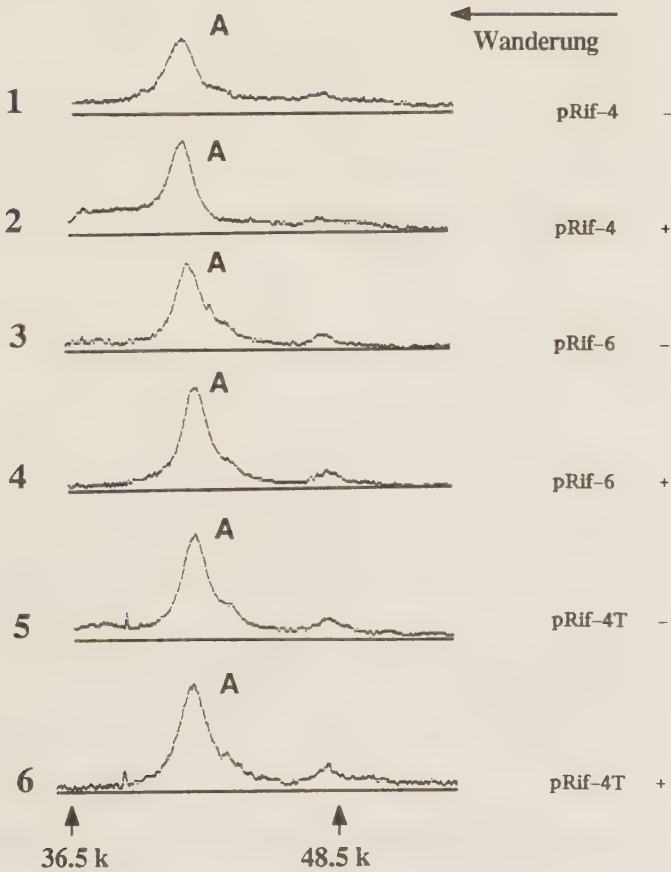


Fig. 54: Immunchemische Messung der Synthese des Rif-IIb Proteins

Die gesamte zelluläre Synthese des Rif-IIb Proteins wurde ohne (-) und mit (+) Induktion nach Elektrophorese und Western-Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern gemessen.

Die Bande A entspricht dem Protein Rif-IIb.

Bei der densitometrischen Auswertung wurde auf allen Spuren ein gleicher Standard (entsprechend 100%) verwendet.

Die Intensität von A - dem Rif-IIb Protein - bleibt mit oder ohne Induktion bei pRif-4 (Fig. 54, Spuren 1 und 2), pRif-6 (Spuren 3 und 4) und pRif-4T (Spuren 5 und 6) im wesentlichen unverändert. Auch bei den verschiedenen Plasmiden - pRif-4, pRif-6 und pRif-4T - bleibt die Intensität von A in etwa gleich hoch (Fig. 54).

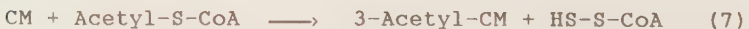
Die gesamte Synthese des Rif-IIb Proteins durch T7 und *E. coli* Transkription ist offenbar unabhängig von der Art des Vektors (also auch von der Anwesenheit des Terminators) und sogar von der Durchführung des Induktionsschritts. Dies steht in deutlichen Widerspruch zur Expression des Tet-Proteins (vgl. Fig. 48).

3.4. Messung der Cat-Gen Expression durch Bestimmung der Enzymaktivität

In *E. coli* K38/pGP1-2 mit Cat-Plasmiden (vgl. Fig. 19 und 21) konnte bei einer Induktion der T7 RNA-Polymerase die Synthese von Cat-mRNA (vgl. Erg., 2.3.) und des Cat-Proteins gezeigt werden (vgl. Erg., 3.1.).

In diesem Kapitel sollte nun die Synthese des Cat-Proteins quantitativ durch Messung seiner Enzymaktivität erfasst werden. Durch Vergleich der Plasmide pCat-6 und pCat-6T sollte die Wirkung des Terminators T hinter dem Cat-Gen im T7 Expressionssystem von Tabor und Richardson (1985) gemessen werden.

Das Antibiotikum Chloramphenicol (CM) hemmt durch Bindung an bakterielle Ribosomen die Elongation bei der Proteinbiosynthese (Shaw, 1975). Eine bakterielle Resistenz gegen CM wird durch das Enzym Chloramphenicol-Acetyltransferase vermittelt, von dem folgende Reaktion (Shaw, 1975) katalysiert wird:



Das 3-Monoacetylderivat von CM besitzt bereits keine messbare antibiotische Aktivität und steht über eine nicht Enzym-katalysierte Wanderung der Acylgruppe im Gleichgewicht mit 1-Acetyl-CM (Shaw, 1975):



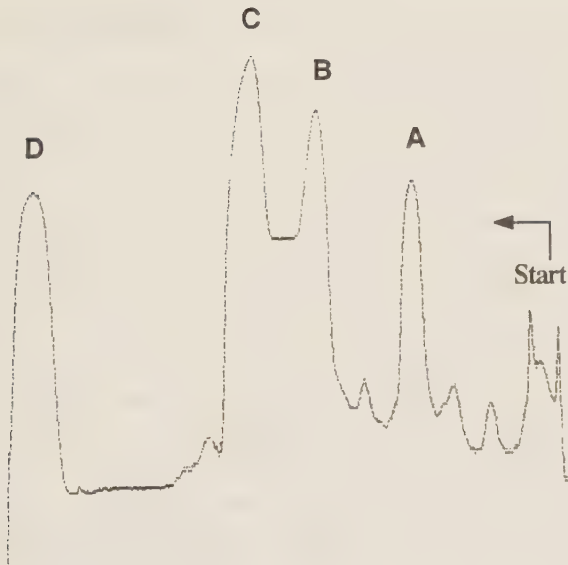
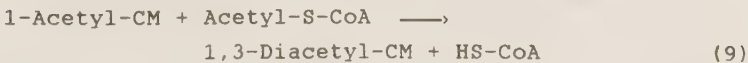


Fig. 55: Analyse der Reaktionsprodukte bei der Acetylierung von Chloramphenicol

[^{14}C] Chloramphenicol wurde in Gegenwart von Acetyl-Coenzym A mit gereinigter Chloramphenicol-Acetyltransferase inkubiert. Das Produktgemisch wurde chromatographisch aufgetrennt. Bei A handelt es sich um nicht umgesetztes CM, bei B um 1-Acetyl-CM, bei C um 3-Acetyl-CM und bei D um 1,3-Diacetyl-CM.

Aus 1-Acetyl-CM kann in einem weiteren enzymkatalysierten Reaktionsschritt 1,3-Diacetyl-CM entstehen (Shaw, 1975):



Die Messung der Cat-Aktivität ist eine Standard-Methode zur Bestimmung der Stärke von Promotoren (Close und Rodriguez, 1982). In dieser Arbeit sollte nun die Wirkung eines Terminators ermittelt werden.

Die Aktivität des Cat-Enzyms wurde durch Messung der Acetylierung von [^{14}C] Chloramphenicol nach Gorman *et al.* (1982) bestimmt. Die Analyse

der Reaktionsprodukte erfolgte mittels Dünnschicht-Chromatographie (vgl. Meth., 12.2.).

Zur Charakterisierung der Reaktionsprodukte wurden ^{14}C -CM und Acetyl-S-CoA mit gereinigtem Cat-Enzym inkubiert. Dabei konnten 4 radioaktiv markierte Substanzen A, B, C und D beobachtet werden (Fig. 55). Nach Gorman *et al.* (1982) handelt es sich mit steigender Mobilität auf dem Chromatogramm bei A um nicht umgesetztes CM, bei B um 1-Acetyl-CM, bei C um 3-Acetyl-CM und bei D um 1,3-Diacetyl-CM. Die Retentionswerte wurden mit 0,21 für CM, 0,29 für 1-Acetyl-CM, 0,38 für 3-Acetyl-CM und 0,65 für 1,3-Diacetyl-CM bestimmt.

Neben der Cat-Aktivität von K38/pGP1-2 mit pCat-6 und pCat-6T wurde auch die Cat-Aktivität von JM83 mit pCat-6 (ohne T7 RNA-Polymerase) ermittelt. Dadurch sollte geprüft werden, wie stark die Expression des Cat-Gens auf pCat-6 durch *E. coli* Promotoren stattfindet.

Die Induktion der Bakterien geschah aus einer stationären Übernachtskultur (30°C) durch 25minütige Inkubation bei 42°C und Rifampicin-Zugabe (vgl. Meth., 9.4.). Nach weiterer 2stündiger Inkubation erfolgte die Lysis der induzierten und der nicht induzierten (30°C und kein Rifampicin) Bakterien (Meth., 12.1.). Sofort danach wurde die Cat-Aktivität der verschiedenen Zellextrakte getestet (Meth., 12.2.).

Die Analyse der Reaktionsprodukte ergab drei Banden auf dem Chromatogramm. Nach ihrer Mobilität sollte es sich bei ihnen um nicht umgesetztes CM, sowie um 1-Acetyl-CM und 3-Acetyl-CM mit Retentionswerten von 0,17 - 0,23 für CM, 0,30 - 0,33 für 1-Acetyl-CM und 0,43 für 3-Acetyl-CM handeln.

Das diacetylierte Produkt 1,3-Diacetyl-CM, das nach Gleichung (7) entsteht, wurde nicht gefunden. Die Ursache dafür ist die sehr langsame Bildung von 1,3-Diacetyl-CM gegenüber 3-Acetyl-CM (Shaw, 1975), das erst bei weitgehender Modifikation von CM auftritt (vgl. Fig. 55).

Zur Auswertung des Experiments wurden die relativen Intensitäten der Banden von CM und seiner Mono-Acetyl-derivate auf jeder Spur des Autoradiogramms densitometrisch gemessen. Die zeitabhängige Acetylierung von CM ist in Fig. 56 dargestellt.

Bei pCat-6 in JM83 (ohne das T7 RNA-Polymerase Gen) findet nur geringe Acetylierung von Chloramphenicol statt (6% nach 20 min). Die Induktion führt nur zu einer sehr schwachen Zunahme der Cat-Aktivität (Fig. 56 A).

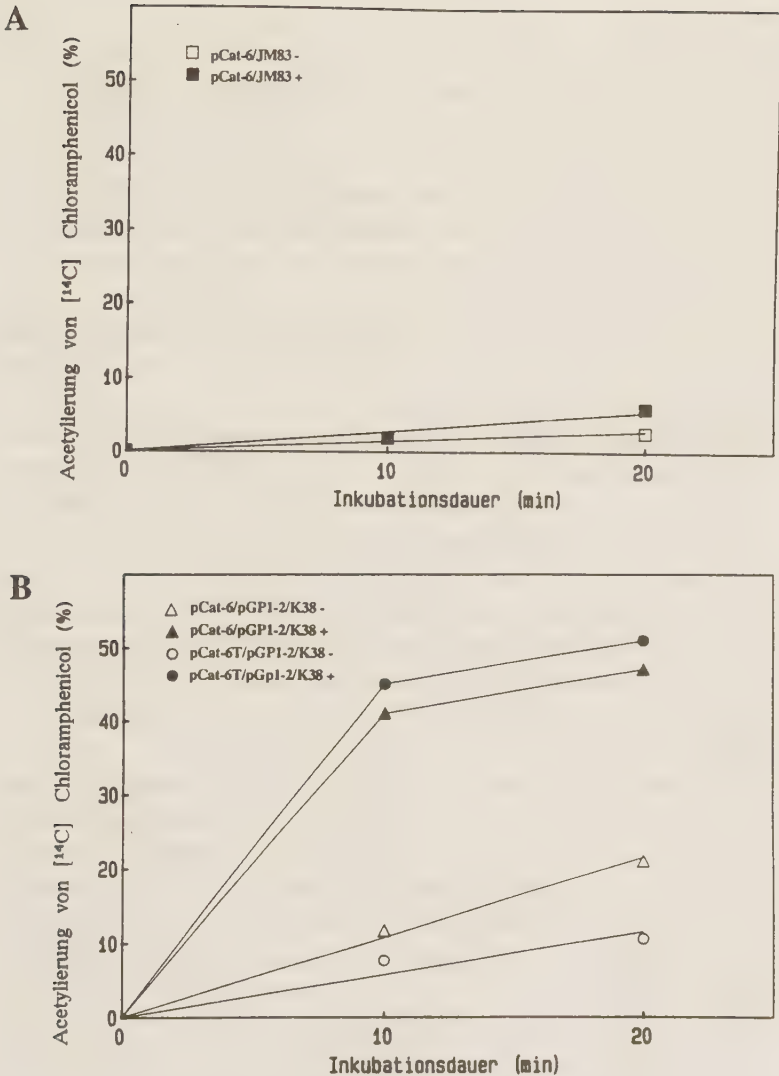


Fig. 56: Messung der Cat-Enzymaktivität in Bakterienextrakten

Die Enzymaktivität von Cat in *E. coli* Zellextrakten ohne (-) und mit (+) Induktion wurde durch eine Acetylierung von [^{14}C] Chloramphenicol gemessen.

A) pCat-6 in JM83

B) pCat-6 und pCat-6T in K38/pGP1-2

Die geringe Cat-Aktivität in JM83 bedeutet, daß keine effiziente Expression des Cat-Gens auf pCat-6 durch eine Sequenz mit *E. coli* Promotoreigenschaft erfolgen kann.

Wenn man dagegen die Cat-Aktivität bei pCat-6 und pCat-6T in K38/pGP1-2 betrachtet (Fig. 56B), findet man bereits ohne Induktion bei beiden Plasmiden eine deutlich höhere Cat-Aktivität als bei pCat-6 in JM83 (Fig. 56A). Die Enzymaktivität bei pCat-6T (mit Terminator T) ist nur halb so groß wie bei pCat-6.

Nach Induktion ist eine starke Zunahme der Cat-Aktivität bei beiden Plasmiden zu erkennen. Die Cat-Aktivität bei pCat-6T ist mit Induktion geringfügig höher als bei pCat-6 (Fig. 56B).

Zunächst fällt auf, daß eine geringe Expression des Cat-Gens durch die T7 RNA-Polymerase bereits ohne Induktion erfolgt. Dies ist offenbar durch eine unvollständige Repression der Synthese von T7 RNA-Polymerase bedingt und steht im Einklang mit früheren Ergebnissen (vgl. Kap. 3.1., 3.2. und 3.3.). Wie auch bei Tet-Plasmiden (3.1. und 3.2.) bewirkt die Anwesenheit des Terminators T eine deutliche Reduzierung der Expression eines Gens - 5'-stromaufwärts von T - durch die T7 RNA-Polymerase. Die Anwesenheit eines *in vivo* wirksamen Terminators wie T besitzt also einen signifikanten Einfluß auf die Proteinbiosynthese im T7 System von Tabor und Richardson (1985).

Nach dem Induktionsschritt wird - wie bei der Expression des Tet-Gens (Fig. 48) - eine Stimulation der Synthese des Cat-Proteins gefunden. Allerdings zeigt sich beim Cat-Protein nach der Induktion (wie schon bei Fig. 50) und im Gegensatz zum Tet-Protein (Fig. 48) keine Reduzierung der Genexpression durch den Terminator T. Somit scheint die Wirkung des Terminators auf die Genexpression von der Art des Gens abhängig zu sein.

DISKUSSION

Spezies-Spezifität der Erkennung von Terminationssignalen

Bei Untersuchungen zur Wirkung von Terminationssignalen bei unterschiedlichen Organismen und RNA-Polymerasen wurde gefunden, daß ein Terminator aus *Streptomyces lividans* *in vivo* bei *E. coli* wirksam ist (Deng *et al.*, 1987). Auch die Faktor-unabhängigen *E. coli* Terminatoren *ampC* (Jaurin und Cohen, 1984) und Lambda tR1 (Brawner *et al.*, 1985) sind *in vivo* in *S. lividans* funktionsfähig. Für das Vorhandensein von korrekten 3'-Termini bei Transkripten des U1 RNA Gens (Murphy *et al.*, 1982), den Histon-Genen (Birnstiel *et al.*, 1985) und auf dem SV40 Genom (Hay *et al.* 1982) sind Sequenzbereiche notwendig, die prokaryotischen Terminatoren ähnlich sind. Es konnte sogar direkt gezeigt werden, daß die menschliche Polymerase II *in vitro* den Lambda 4S Terminator erkennt (Hatfield *et al.*, 1983). Man könnte daher vermuten, daß Terminationssignale ubiquitär wirksam sind.

Andererseits sind die Lambda Terminatoren t_{int} und tR1 - im Gegensatz zu t4S - für die menschliche Polymerase II nicht wirksam (Hatfield *et al.*, 1983). Auch findet kein Erkennen der SUP4 (RNA-Polymerase III) und CYC-1 Terminatoren (RNA-Polymerase II) aus *Saccharomyces cerevisiae* durch die *E. coli* RNA-Polymerase statt (Platt, 1986). Es existiert offenbar doch eine gewisse Spezies- bzw. Enzym-Spezifität in der Wirksamkeit von Terminationssignalen.

Ein Erkennen von *E. coli* Terminationssignalen durch die T7 RNA-Polymerase ist daher keineswegs selbstverständlich, vor allem wenn man die Unterschiede beider Enzyme betrachtet. So ist die *E. coli* RNA-Polymerase ein komplexes, aus 5 Untereinheiten (α_2 , β , β' , σ) aufgebautes Enzym, während die T7 RNA-Polymerase nur aus einer Polypeptidkette besteht (Moffat *et al.*, 1984). Zwischen beiden Enzymen sind geringe Homologien auf Protein-Ebene nur innerhalb eines sehr kurzen Bereichs bekannt (Hartmann *et al.*, 1988). Auch besitzt die T7 RNA-Polymerase starke Homologien zu einer Untereinheit der mitochondrialen RNA-Polymerase aus Hefe, welche wiederum keinerlei Homologien zur *E. coli* RNA-Polymerase aufweist (Masters *et al.*, 1987). Weiterhin sind die Promotorspezifitäten der T7 und der *E. coli* RNA-Polymerase völlig verschieden (Dunn und Studier, 1983).

Beide Enzyme katalysieren die gleiche Reaktion - eine DNA-abhängige RNA-Synthese aus Ribonukleosid-Triphosphaten. Diese Reaktion wird aber von unterschiedlichen Inhibitoren beeinflusst. So ist die Transkription durch T7 RNA-Polymerase nicht sensitiv gegenüber Rifampicin (Tabor und Richardson, 1985), das jedoch ein wirkungsvoller Inhibitor für die Transkription durch *E. coli* und andere eubakterielle RNA-Polymerasen ist (Hartmann *et al.*, 1985).

Bisher war es unklar, ob die Termination der Transkription bei T7 nach dem gleichen Mechanismus wie bei *E. coli* abläuft. Ein Argument, das für einen unterschiedlichen Terminationsmechanismus bei T7 und *E. coli* spricht, ist die Beobachtung, daß der frühe Terminator TE auf dem T7 Genom (Position 7588) für die *E. coli* RNA-Polymerase (Fig. 1) von der T7 RNA-Polymerase nicht erkannt wird (Dunn und Studier, 1980).

Andererseits befindet sich direkt 5'-stromaufwärts der späten T7 Terminationsstelle TPhi (Fig. 1) ein Sequenzabschnitt, dessen Charakteristik einem *E. coli* Terminator mit einem palindromen Bereich auf der DNA gefolgt von einer T-reichen Region entspricht (Dunn und Studier, 1983).

Eingrenzung der für die Termination durch T7 RNA-Polymerase notwendigen Elemente

Ein Ziel dieser Arbeit war es, durch Verkleinerung von TPhi diejenigen Elemente, welche für eine Termination mit T7 RNA-Polymerase erforderlich sind, zu charakterisieren. Zunächst war die Termination bei TPhi auf einem 1,4 kb langen T7 Fragment (Position 22855 bis 24270) gefunden worden (Studier und Rosenberg, 1981). Rosenberg *et al.* (1987) konnten vor kurzem sogar Termination an einem 123 bp langen T7 Fragment (Position 24106 bis 24128) zeigen. In dieser Arbeit wurde jetzt auf einem noch wesentlich kürzeren Abschnitt des T7 Genoms von Position 24164 bis 24214 - enthalten im 58 bp langen synthetischen Fragment T - eine Termination der Transkription nachgewiesen (Fig. 23). Dabei befindet sich auf dem Fragment T nur derjenige Abschnitt des T7 Genoms, auf dem bei Transkription die RNA-Sekundärstruktur A gefolgt von 6 U-Resten gebildet werden kann (Fig. 57). Diese beiden Strukturelemente sind offenbar bei T7 - wie bei *E. coli* (Brendel und Trifonov, 1984) - hinreichend für das Eintreten eines Terminationsereignisses.

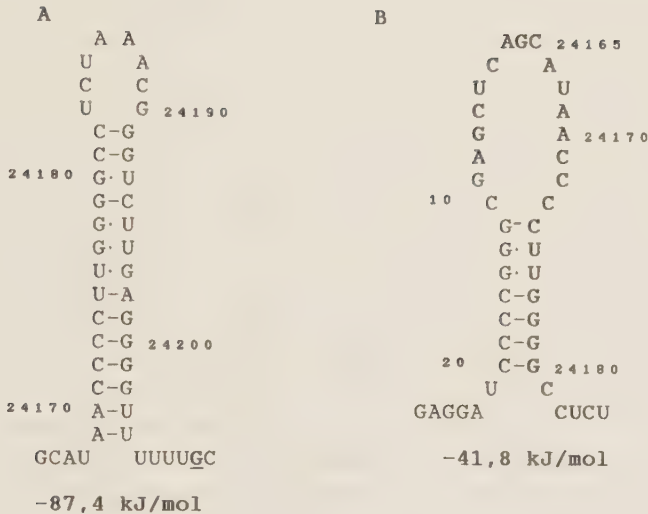


Fig. 57A: RNA-Sekundärstruktur des T7 Terminators T

Die RNA-Sekundärstruktur des DNA-Fragments T (24164 bis 24214 von T7) entspricht der Sekundärstruktur von TPhi (Dunn und Studier, 1983). Die Terminationsstelle (Position 24209) ist unterstrichen.

Fig. 57B: Antiterminator-Sekundärstruktur des pT7-4 Polylinkers und der 5'-Hälfte des Terminators T

Die Nukleotide der Insertion T und ihre Position auf dem T7 Genom sind fett gekennzeichnet. Die Position der Nukleotide auf dem Vektor pT7-4 ist ebenfalls angegeben.

Die Haarnadel-Stabilitäten wurden nach Tinoco *et al.* (1973) ermittelt.

Die thermodynamische Stabilität der RNA-Haarnadel A wurde nach Tinoco *et al.* (1973) berechnet und beträgt -87,4 kJ/mol (Fig. 57A). Die Termination an T findet zwar am gleichen Nukleotid - T7 Position 24209 - (Fig. 38, Dunn und Studier, 1983), aber mit einer wesentlich geringeren Effizienz als am 126 bp langen Fragment *HinP* C (Position 24104 bis 24229 des T7 Genoms) statt (Tab. 2 und 3).

Bei *E. coli* werden als wesentliche Parameter für die Effizienz eines Terminators die thermodynamische Stabilität der RNA-Sekundärstruktur und

die Zahl der nachfolgenden T-Reste betrachtet (von Hippel *et al.*, 1984). Bei dem T7 DNA-Fragment *HinP C* (24102 bis 24229) und dem synthetischen Fragment T (24164 bis 24214) sind diese beiden Parameter gleich. Für die unterschiedliche Effizienz sind offenbar die 5'-stromaufwärts der Terminationsstelle liegenden Sequenzbereiche verantwortlich.

Es wäre möglich, daß die Effizienz des T7 Fragments *HinP C* durch eine 5'-stromaufwärts der RNA-Haarnadel befindliche und T7-spezifische Nukleotidsequenz erhöht wird. Eine andere Erklärung ist allerdings, daß der Unterschied durch einen, die Effizienz von T verringernden Effekt hervorgerufen wird. Tatsächlich findet man bei T eine stabile RNA Sekundärstruktur B mit einer thermodynamischen Stabilität von $-41,8$ kJ/mol aus 5'-stromaufwärts gelegenen Sequenzbereichen des Vektors (Position 17 bis 9 auf pT7-4) mit einer Region des Terminators (Position 24174 bis 24180 von T7) (Fig. 57B). Für die Bildung der zur Termination führenden Sekundärstruktur A ist somit zunächst die Auflösung von B erforderlich. Dieser Vorgang stellt vermutlich eine kinetische Barriere zur Ausbildung der Terminator-Struktur A dar, so daß die Sekundärstruktur B offenbar als Antiterminator wirkt.

Die Existenz der Antiterminator-Struktur B erlaubt eine Erklärung für die unterschiedliche Effizienz von T und *HinP C*, die im Einklang mit dem *E. coli* Terminationsmodell steht. So ist eine Beeinflussung der Termination durch Wechselwirkung verschiedener RNA-Sekundärstrukturen bereits bei den Attenuatoren im Leaderbereich des *trp* Operons bei *E. coli* und *Serratia marcescens* bekannt (Landick *et al.*, 1987).

Auswirkung von Modifikationen der Basenfolge von T auf die Termination

Am T7 DNA-Fragment *HinP C* in umgekehrter Orientierung - im Einklang mit Rosenberg *et al.* (1987) - und am synthetischen DNA-Fragment K, das eine zum natürlichen T7 Terminator TPhi transverse Nukleotidsequenz besitzt, findet keine Termination statt (vgl. Fig. 27 und Fig. 25).

Bei Transkription von *HinP C* in inverser Orientierung und K (mit einer transversen Nukleotidsequenz von T) entstehen RNA-Sekundärstrukturen ähnlich wie bei TPhi mit einer thermodynamischen Stabilität von $-77,5$ kJ/mol (Fig. 58), bei denen allerdings die 3'-stromabwärts gelegene Folge von 6 U-Resten fehlt. Offenbar ist diese oligo(rU)Sequenz am Ende einer RNA-Haarnadel-Struktur für die Termination bei T7 notwendig.

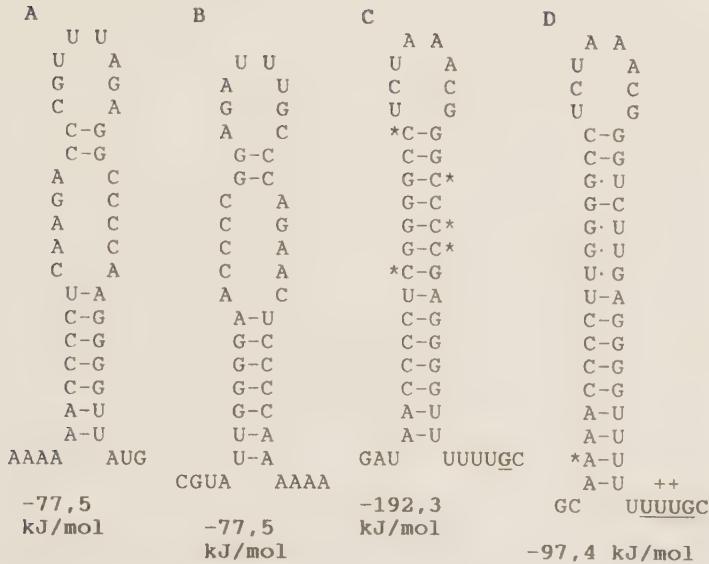


Fig. 58: RNA-Sekundärstruktur der Terminatoren TPhi-invers, K, S1 und S2 (Stabilität nach Tinoco *et al.*, 1973)

A) Terminator TPhi-invers

B) Terminator K (transverse Nukleotidsequenz von T)

C) Terminator S1

Die Substitutionen im Vergleich zu T sind gekennzeichnet (*).

Die Terminationsstelle ist unterstrichen.

D) Terminator S2

Die Substitutionen (*) und Insertionen (+) im Vergleich zu T sind gekennzeichnet. Die Terminationsstellen sind unterstrichen.

T-reiche Regionen am Ende von Terminatoren sind auch charakteristisch bei *E. coli* (von Hippel *et al.*, 1984). *E. coli* Terminatoren sind sogar in inverser Orientierung nur dann wirksam, wenn sich wie beim *rho* Gen 5'-stromauf des Terminators eine A-reiche Region auf der Matrize befindet (Pinkham und Platt, 1983), so daß bei Transkription in inverser Orientierung eine Folge von U-Resten 3'-stromab der Haarnadel liegt.

Eine Verlängerung der oligo(dT) Folge am 3'-Ende von 6 auf 8 T-Reste beim synthetischen Terminator S2 hatte *in vitro* hinter dem Cat-Gen bei Verwendung einer Matrize ohne Restriktionsschnitt (Tab. 3) eine leichte Erhöhung der Effizienz zur Folge. Tendenziell steht dies im Einklang mit Ergebnissen von Christie *et al.* (1981), die bei *E. coli* ebenfalls eine Verbesserung der Effizienz durch eine Verlängerung der oligo(dT) Folge am Ende des Terminators fanden. Das Fehlen einer Verbesserung der Termination bei S2 gegenüber T an einer geschnittenen Matrize (vgl. Tab. 2) kann auf die geringe Effizienz (5-10%) von T und S2 zurückzuführen sein. Die Erhöhung der thermodynamischen Stabilität der RNA-Haarnadelstruktur bei S1 zeigte bei Verwendung einer Matrize mit und ohne Restriktionsschnitt eine sehr deutliche Verstärkung der Termination (Tab. 2 und 3). Dies entspricht auch den Erkenntnissen über die Termination bei *E. coli* (Christie *et al.*, 1981; Rosenberg *et al.*, 1983; Stroynowski *et al.*, 1983).

Termination bei Verlangsamung der Elongation

Ein Pausieren der *E. coli* RNA-Polymerase findet bei der Transkription palindromer Sequenzbereiche der Matrize statt und ist die Voraussetzung für einen Terminationsvorgang (Yager und von Hippel, 1987).

Die Verringerung der Konzentration eines Substrats bewirkt bei *E. coli* eine Verlangsamung der Elongation beim Einbau von mehreren dieser Substratmoleküle in die RNA-Kette (Kassavetis und Chamberlin, 1981; Reisbig und Hearst, 1981). Somit können "künstliche" Pausenstellen für die RNA-Polymerase geschaffen werden.

Demnach sollte eine selektive Verringerung der UTP-Konzentration auch bei der T7 Transkription zur Verlangsamung der Elongation beim Einbau mehrerer U-Reste in die RNA führen. Nun wurde bei *in vitro* RNA-Synthese mit 5-10fach geringerer UTP-Konzentration gegenüber den anderen NTPs an U-reichen Regionen auf der RNA eine Verstärkung der Termination oder das Entstehen neuer Terminationsstellen beobachtet (Fig. 40).

Somit scheint auch bei T7 - wie bei *E. coli* - die Verlangsamung der Elongation bzw. ein Pausieren der RNA-Polymerase eine notwendige Voraussetzung für die Termination zu sein. Dies ist neben den bereits diskutierten Befunden (Auswirkung von Modifikationen in der Nukleotidsequenz von T auf die Termination) ein wichtiges Argument für einen gleichartigen Mechanismus der Termination bei T7 und *E. coli*.

Wirksamkeit von *E. coli* Terminatoren für die T7 RNA-Polymerase

Die *E. coli* Terminatoren *rrnB*-T1 und *rrnB*-T2 (Brosius *et al.*, 1981; Schmidt und Chamberlin, 1987), in deren Bereich RNA-Sekundärstrukturen mit einer Stabilität von -137,7 bzw. -86,9 kJ/mol entstehen können (Fig. 59), sind *in vitro* (Fig. 32) und *rrnB*-T1 auch *in vivo* (Fig. 47) bei Transkription durch die T7 RNA-Polymerase wirksam. Eine Termination an *rrnB*-T1 *in vitro* wurde bereits von Steen *et al.* (1986) bei der Expression des gesamten *rrnB* Operons durch T7 RNA-Polymerase gefunden, die im Gegensatz zu meinen Befunden als nicht sehr effizient bezeichnet wurde. Auch der auf Grund der Nukleotidsequenz (Heinrich, 1987) postulierte *E. coli* Terminator Rif-TB an Position 80 auf dem Rifampicin-Resistenzgen *3d^{rif}*, in dessen Bereich eine RNA-Sekundärstruktur mit -78,6 kJ/mol Stabilität entstehen kann (Fig. 59), wird von der T7 RNA-Polymerase *in vitro* erkannt (Fig. 36).

Dagegen wurde am zweiten postulierten *E. coli* Terminator Rif-TY (Heinrich, 1987) an Position 710 auf *3d^{rif}* - ebenfalls mit den klassischen Strukturelementen - keine Termination beobachtet (Fig. 36). Allerdings ist die thermodynamische Stabilität der RNA-Haarnadel-Sekundärstruktur bei Rif-TY mit -47,6 kJ/mol wesentlich geringer als bei allen Terminatoren, die von der T7 RNA-Polymerase erkannt werden (vgl. Fig. 59).

Auf diese Weise könnte auch das Nicht-Erkennen des frühen *E. coli* Terminators TE auf dem T7 Genom durch die T7 RNA-Polymerase erklärt werden (Dunn und Studier, 1980), bei dem die RNA-Haarnadel nur eine Stabilität von -52,7 kJ/mol besitzt (Fig. 59).

Die experimentellen Daten zeigen, daß T7 RNA-Polymerase Terminations-signale für die *E. coli* RNA-Polymerase spezifisch erkennt. Nur muß aber die Stabilität der RNA-Sekundärstrukturen bei solchen Terminatoren deutlich über -50 kJ/mol betragen.

Die genaue Nukleotidsequenz ist nicht notwendig für das Eintreten der Termination mit T7 RNA-Polymerase. Wie bei *E. coli* (Brendel und Trifonov, 1984) kann bei dem T7 Enzym eine beliebige palindrome Sequenz gefolgt von T-Resten als Terminator wirksam sein.

Auf Grund der nur geringen Verwandtschaft von *E. coli* und T7 RNA-Polymerase (Masters *et al.*, 1987; Hartmann *et al.*, 1988) auf Protein-Ebene ist zu vermuten, daß die Termination alleine durch Nukleinsäure-Wechselwirkungen (RNA-Haarnadeln, geringe Stabilität des rU-dA Hybrids) hervorgerufen wird.

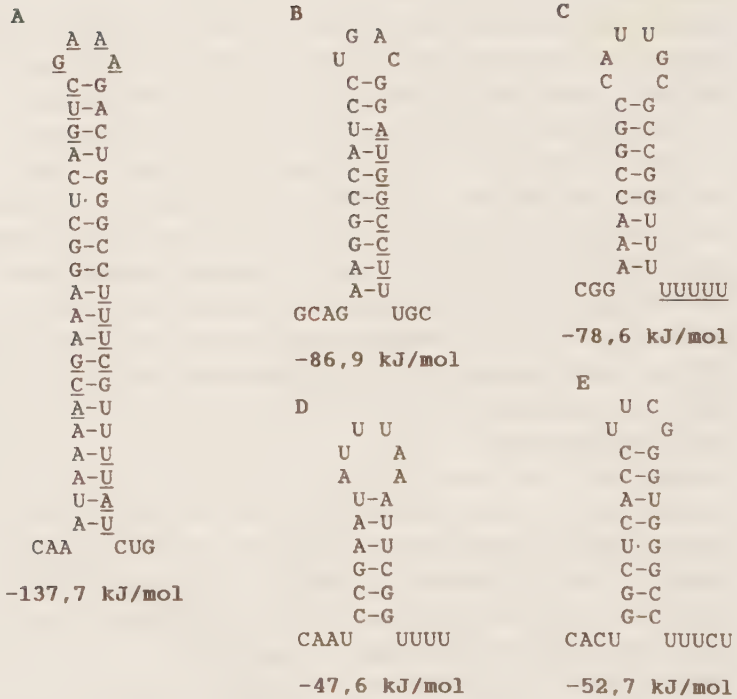


Fig. 59: RNA-Sekundärstruktur der Terminatoren *rrnB*-T1, *rrnB*-T2, Rif-TB, Rif-TY und TE (Stabilität nach Tinoco *et al.* (1973))

A) Terminator *rrnB*-T1 (Brosius *et al.*, 1981)

B) Terminator *rrnB*-T2 (Brosius *et al.*, 1981).

C) Terminator Rif-TB (Heinrich, 1987).

D) Terminator Rif-TY (Heinrich, 1987).

E) Terminator TE (Dunn und Studier, 1983).

Die ungefähre Lage der Terminationsstellen für die T7 RNA-Polymerase ist bei A, B und C angegeben (unterstrichen).

Es existiert ein Modell zur Termination bei *E. coli*, das die Existenz einer spezifischen Bindungsstelle für RNA-Sekundärstrukturen auf der RNA-Polymerase ("jamming site") postuliert und dem Enzym eine aktive Rolle beim Terminationsprozeß zuweist (Yager und von Hippel, 1987). Dieses Modell scheint aufgrund des sehr ähnlichen Terminationsmechanismus bei *E. coli* und T7 - verbunden mit der sehr geringen Sequenz-Homologie - unwahrscheinlich.

Nicht-klassischer T7 Terminator Rif-TA

Bei *E. coli* existieren Faktor-unabhängige Terminationsstellen, denen die charakteristischen Merkmale - RNA-Sekundärstruktur und oligo(dT) Folge (Rosenberg und Court, 1979) - fehlen. Hier sind z.B. der *lacI* Terminator (Horowitz und Platt, 1982), der *rho* Attenuator (Brown *et al.*, 1982) und der RNA III Terminator auf dem Antibiotikum-Resistenzplasmid R1 (Rosen *et al.*, 1981) zu nennen.

Es stellte sich die Frage, ob auch die T7 RNA-Polymerase an Sequenzen terminiert, an denen sich kein Palindrom auf der Matrize befindet. So hätte es sich bei dem experimentell von Golomb und Chamberlin (1974) postulierten, aber aus der Nukleotidsequenz nicht ersichtlichen (Dunn und Studier, 1983) Terminator bei Position 39400 des T7 Genoms um ein derartiges nicht-klassisches Terminationssignal handeln können. In dieser Arbeit wurde jedoch auf einem Fragment von Position 38802 bis 39680 des T7 Genoms *in vitro* keine Termination gefunden (Fig. 27).

Ebenfalls keine klassische Haarnadel-Struktur kann sich im Bereich des T7 Terminators Rif-TA auf 3d^{rif} ausbilden (Fig. 36).

Es ist aber denkbar, daß andere Formen von RNA-Sekundärstrukturen wie Doppelhaarnadeln (Astell *et al.*, 1979) oder Pseudo-Knoten (Puglisi *et al.* 1988) eine Termination bewirken. Weiterhin wäre das Auftreten nicht-klassischer Hybrid-Basenpaare in RNA-Sekundärstrukturen möglich. So wurde vor kurzem entdeckt, daß bei DNA die Ausbildung stabiler A-G und G-G Basenpaare erfolgen kann (Brown *et al.*, 1986; Henderson *et al.*, 1987).

Bei Rif-TA kann man unter Annahme eines rG-rG Hybridbasenpaars eine RNA-Haarnadel formulieren (Fig. 60). Da diese Struktur nur ein rC-rG Hybridbasenpaar enthält, ist sie jedoch nach den Regeln von Tinoco *et al.* (1973) zur Stabilität von RNA-Haarnadeln energetisch instabil.

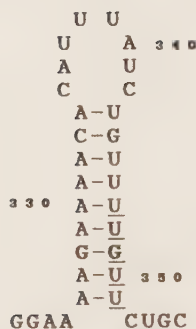


Fig. 60: RNA-Sekundärstruktur des T7 Terminators Rif-TA

Potentielle RNA-Haarnadel bei Ausbildung eines G-G Basenpaars (fett). Die Nukleotide von 3d^{rif} wurden nach Heinrich (1987) bezeichnet. Der Bereich, in dem Termination stattfindet, ist unterstrichen.

Somit ist es fraglich, ob diese Struktur für das Eintreten der Termination bei Rif-TA eine Rolle spielen kann.

Nicht auszuschließen ist auch eine Termination durch Destabilisierung des DNA-RNA Hybrids im Transkriptions-Komplex auf Grund von Nukleotidsequenz-bedingten Anisotropien (Trifonov, 1980; Calladine, 1982).

Bemerkenswert ist ein 30 bp langer Abschnitt der Matrize mit sehr hohem AT-Gehalt vor der Terminationsstelle Rif-TA (Fig. 36). Nun wurde gefunden, daß die thermische Instabilität von AT-reichen Regionen der DNA im Zusammenhang mit funktionellen Domänen der Transkription steht (Moreau *et al.*, 1980). Weiterhin ist DNA (pBR322) in AT-reichen Regionen und im Bereich bekannter *E. coli* Promotoren und Terminatoren besonders sensitiv für die Spaltung mit einer Nuklease, was auf neuartige DNA-Konformationen in diesen Bereichen hindeutet (Sheflin und Kowalski, 1985). Es wäre somit denkbar, daß die besondere Basenzusammensetzung im Bereich von Rif-TA eine Destabilisierung des RNA-DNA Hybrids bedingt und für die Termination verantwortlich ist.

Ohne weitere Experimente zur genauen Bestimmung der Terminationsstelle oder Deletionsanalysen kann jedoch der zur Termination erforderliche

Bereich der Matrize und die genaue Ursache der Termination nicht aufgeklärt werden.

Neben der Nukleotidsequenz ist auch die Lage von Rif-TA innerhalb der kodierenden Region des Gens für das Protein Rif-I bemerkenswert. Unter der Voraussetzung einer Wirksamkeit *in vivo* bei Transkription durch die *E. coli* RNA-Polymerase könnte es sich bei Rif-TA um einen Attenuator handeln. So sind Attenuatoren nicht nur bei Operons für die Biosynthese von Aminosäuren, sondern auch z.B. bei den *E. coli* Operons *phsT*, *pyrBI*, *ampC*, sowie *rmb*, *rnc* und *rng* bekannt und bewirken auf unterschiedliche Art und Weise eine Kontrolle der Transkription (Landick und Yanofsky, 1987).

Für die potentielle Funktion von Rif-TA als Attenuator spricht auch die Lokalisierung der genetischen Elemente auf 3d^{r1f}. Das für das Protein Rif-I kodierende Gen befindet sich nur um 108 bzw. 12 bp 3'-stromab von zwei potentiellen *E. coli* Promotoren P I und P II (Heinrich, 1987 und Fig. 33). Der Terminator Rif-TB könnte dann das Ende eines 5'-stromaufwärts gelegenen Operons bilden. Es könnte sich daher bei dem 3d^{r1f} Fragment um den Beginn eines Operons handeln. Das Gen *rif-I* bildet den ersten offenen Leserahmen dieses Operons, dessen Expression durch Attenuation an Rif-TA kontrolliert würde.

Rho-abhängige Termination der Transkription durch T7 RNA-Polymerase ?

Da der Mechanismus der Termination bei T7 offenbar sehr ähnlich ist wie bei *E. coli*, wäre es denkbar, daß eine Termination der T7 RNA-Polymerase durch Protein-Faktoren verstärkt oder an neuen Stellen hervorgerufen werden kann. Bislang wurde der Einfluß von *E. coli* Proteinen auf die Termination mit T7 RNA-Polymerase noch nicht untersucht.

Wenn die Aktivität eines *E. coli* Terminationsfaktors nicht auf einer spezifischen Bindung an die *E. coli* RNA Polymerase beruht, könnte er auch Termination bei der T7 RNA-Polymerase bewirken.

So bindet nach Bear und Pebody (1988) das Protein Rho an bestimmte Sequenzbereiche auf der RNA (Rho attaching sites), kann sich unter ATP-Hydrolyse entlang der RNA-Kette fortbewegen und bewirkt eine Termination an bestimmten Stellen auf der Matrize, an denen ein Pausieren der Elongation stattfindet.

Es gibt zwar Hinweise, die auch für eine Wechselwirkung von Rho mit der *E. coli* RNA-Polymerase sprechen (Goldberg und Hurwitz, 1972; Guarente und Beckwith, 1978). Diese Befunde können aber auch auf eine Weise erklärt werden, die keine Bindung von Rho an die *E. coli* RNA-Polymerase erfordert (Bear und Peabody, 1988).

Würde nun eine Rho abhängige Termination bei Transkription mit T7 RNA-Polymerase beobachtet, so könnte - auf Grund der nur geringen Homologie zwischen T7 und *E. coli* RNA-Polymerase (Masters *et al.*, 1987, Hartmann *et al.*, 1988) - eine spezifische Wechselwirkung von Rho mit der *E. coli* RNA-Polymerase weitgehend ausgeschlossen werden.

Termination *in vitro* und *in vivo*

Für die Termination mit T7 RNA-Polymerase *in vivo* scheinen teilweise andere Kriterien als *in vitro* eine Rolle zu spielen. So konnte die Wirksamkeit der *in vitro* recht effizienten Terminatoren Rif-TA und Rif-TB (Tab. 2) *in vivo* nicht nachgewiesen werden (Fig. 46). Auch war *in vivo* die Effizienz von T, TPhi, S1, S2 und *rrnB*-T1 ähnlich (Fig. 47), obwohl zwischen diesen Terminatoren *in vitro* zum Teil erhebliche Unterschiede gefunden wurden (Tab. 2 und 3).

Diese Beobachtung könnte durch die Aktivität von spezifischen Terminations- bzw. Antiterminationsfaktoren oder auf eine unterschiedliche Helikalität der Matrize oder durch die Anwesenheit bakterieller Chromatin-Proteine zurückzuführen sein.

So wird auch *in vitro* die Transkription mit *E. coli* RNA-Polymerase durch die Anwesenheit von Chromatin-Proteinen wie HU α , HU β (Rouviere-Yaniv und Gros, 1975) und H1 (Spassky *et al.*, 1984) beeinflusst. Auch ist aus Untersuchungen von Schenborn und Mierendorf (1985) bekannt, daß *in vitro* die Transkription durch T7 RNA-Polymerase von der Struktur der Matrize beeinflusst wird.

So war nicht erstaunlich, daß auch in dieser Arbeit eine Abhängigkeit der Termination *in vitro* von den Reaktionsbedingungen und dem Helix-Gehalt der Matrize gefunden wurde (vgl. Tab. 2 und 3). Für den am besten charakterisierten Terminator T haben Änderungen der Reaktionsparameter nur relativ geringe Auswirkungen auf die Effizienz (Tab. 1). Hingegen wurde bei *rrnB*-T1, *rrnB*-T2, S1 und Rif-TA mit 0,5 mM NTP ein deutlicher Rückgang der Termination gegenüber 0,1 mM NTP festgestellt (Tab. 2). Die bei *E. coli* bekannte (Rhodes und Chamberlin, 1974) und

auch bei T7 gezeigte Erhöhung der Elongationsrate mit steigender NTP-Konzentration - entsprechend der wachsenden Inkorporation von [α - 32 P] UTP in RNA (vgl. Tab. 1) - bewirkt offenbar ein kürzeres Pausieren der RNA-Polymerase und dadurch eine Verringerung der Termination. Warum dieser Effekt bei den Terminatoren Rif-TB oder TPhi nicht auftritt (vgl. Tab. 2), bleibt unklar.

Biologische Funktion der T7 Promotoren auf dem *rrnB* Operon ?

Auf dem *E. coli rrnB* Operon befinden sich auch zwei *in vitro* wirksame T7 Promotoren Phi R1 und Phi R2 (Fig. 30 und 32). Bisher waren noch keine spezifische Startstellen für die RNA-Synthese durch T7 RNA-Polymerase auf dem *E. coli* Genom bekannt. Die Nukleotidsequenz im Bereich von Phi R1 und Phi R2, die nur ca. 25 bp entfernt voneinander liegen, zeigt Homologien zu natürlichen T7 Promotoren (Fig. 32).

Chamberlin *et al* (1970) fanden keine nennenswerte Transkription von *E. coli* DNA durch T7 RNA-Polymerase. Dies steht aber nicht im Widerspruch zur Existenz von Phi R1 und Phi R2, an denen die RNA-Synthese *in vitro* nur mit geringer Effizienz im Vergleich zu einem starken T7 Promotor wie Phi 10 stattfindet (Fig. 30). Somit ist eine mögliche biologische Bedeutung von Phi R1 bzw. Phi R2 sehr zweifelhaft, da ihre Homologie zu natürlichen T7 Promotorsequenzen nur durch Zufall bedingt sein kann. Auch ist unklar, ob beide Promotoren bei Transkription durch die T7 RNA-Polymerase *in vivo* aktiv sind.

Andererseits ist jedoch bekannt, daß zur Regulation des Infektionszyklus von T7 bestimmte *E. coli* Genprodukte wie Thioredoxin als Untereinheit der T7 kodierten DNA-Polymerase benötigt werden (Mark und Richardson, 1976). So wäre es denkbar, daß während einer T7 Infektion die Expression von *E. coli* Genen durch die T7 RNA-Polymerase in geringem Ausmaß erforderlich ist, da die *E. coli* Transkription durch das T7 Genprodukt 2 blockiert wird (Dunn und Studier, 1983).

Wirkung eines Terminators auf die Expression von Proteinen durch T7 RNA-Polymerase

Neben dem induzierbaren T7 Expressionssystem von Tabor und Richardson (1985) wurden auch andere Systeme entwickelt, die eine spezifische Genexpression in *E. coli* (Studier und Moffat, 1986) oder in Eukaryonten (Fuerst *et al.*, 1986) durch die T7 RNA-Polymerase ermöglichen.

Ein Nachteil der prokaryotischen Systeme ist, daß sie bei Expression von für *E. coli* toxischen Genen instabil sind, wenn das T7 RNA-Polymerase Gen chromosomal (Studier und Moffat, 1986) oder Plasmid-kodiert (Tabor und Richardson, 1985) in der Zelle vorliegt. Die Ursache hierfür dürfte die Anwesenheit von T7 RNA-Polymerase in der Zelle bereits ohne Induktion sein (Studier und Moffat, 1986; Erg. 3). Somit kann eine Expression des toxischen Gens in einem für die Zelle letalen Ausmaß stattfinden. Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob der Einbau eines Terminators hinter ein Gen die Möglichkeit bietet, dieses Problem zu verringern und somit die Verbesserung von T7 Expressionssystemen zu erreichen.

Die Grundlage für diese Vermutung lieferten Arbeiten von Gentz *et al.* (1981) und Amann *et al.* (1983). Hier wurde gezeigt, daß bei Genexpression durch die *E. coli* RNA-Polymerase und Verwendung eines starken Promotors die Anwesenheit eines Terminators notwendig ist.

Für das T7 System von Tabor und Richardson (1985) konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß ohne Induktion die Expression des Tet- und des Cat-Gens durch die Anwesenheit des Terminators T 3'-stromabwärts des betreffenden Gens reduziert wurde (vgl. Erg. 3.1., 3.2. und 3.4.). Es ist bemerkenswert, daß ein Terminator hinter einem Gen seine Expression reduziert. Indem sich auf diese Weise die Konzentration von potentiell toxischen Genprodukten bei Vermehrung der *E. coli* Bakterien ohne Induktion verringert, kann tatsächlich eine gewisse Stabilisierung des T7 Systems bewirkt werden. So wurde das angestrebte Ziel einer Verbesserung des T7 Systems durch Einbau eines Terminators erreicht. In weiteren Experimenten zu diesem Punkt könnte untersucht werden, wie sich andere Terminatoren auf die Genexpression auswirken.

Die verringerte Genexpression bei Anwesenheit eines Terminators ist erklärbar durch die geringe Konzentration der T7 RNA-Polymerase innerhalb der nicht induzierten Zelle und ihre Fähigkeit - ohne Terminator - ein zirkuläres Plasmid *in vitro* (McAllister *et al.*, 1981) und *in vivo* (Tabor und Richardson, 1985) mehrmals zu umrunden. Auf diese Weise werden bei einem Transkriptionszyklus RNA-Moleküle von großer Länge synthetisiert, die mehrere RNA-Kopien des Gens unter Kontrolle des T7 Promotors enthalten.

Wenn dagegen ein Terminator hinter dem Gen liegt, löst sich die T7 RNA-Polymerase dort mit bestimmter Wahrscheinlichkeit von der Matrize

ab. Ein Transkript enthält dann nur eine einzige RNA-Kopie des Gens. Bei der sehr hohen Elongationsrate (Chamberlin *et al.*, 1983) und der geringen Konzentration der T7 RNA-Polymerase in nicht induzierten Zellen ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Transkription vermutlich die Initiation – die Bindung des Enzyms an die Matrize. Daher könnte das Ausmaß der Genexpression durch die Anzahl der bei einem Transkriptionsvorgang erzeugten RNA-Kopien bestimmt sein.

Bei Versuchen zum Einfluß eines Terminators zur Expression eines Gens nach Induktion der T7 RNA-Polymerase-Synthese ergab sich kein eindeutiger Befund. Die Anwesenheit eines Terminators hatte eine Verringerung der Expression des Tet-Gens (Erg. 3.1. und 3.2.), aber nicht des Cat-Gens (Erg., 3.3.) zur Folge.

Synthese des Rif-IIb Proteins

Bei Messung der Biosynthese des Proteins Rif-IIb wurden drei Besonderheiten festgestellt:

- Bereits ohne Induktion des T7 Systems findet eine starke Synthese des Proteins Rif-IIb im Vergleich zum Tet-Protein statt (vgl. Fig. 48 und 49). Dabei erfolgt die beobachtbare Genexpression durch T7 RNA-Polymerase, da selektive Markierung von Rif-IIb mit [³⁵S] Methionin stattfindet und der Hintergrund an *E. coli* Proteinen vernachlässigbar gering ist.
- Die Stimulierung der RNA-Synthese *in vivo* durch Induktion ist im Vergleich zu den Tet-Plasmiden relativ gering (vgl. Fig. 43 und Fig. 46).
- Bei der immunchemischen Bestimmung der Gesamtexpression von Rif-IIb durch T7 und *E. coli* RNA-Polymerase ergab sich keine Stimulierung durch die Induktion der T7 RNA-Polymerase. Eine gezielte Überexpression des Rif-IIb Proteins ist im T7 System von Tabor und Richardson (1985) offenbar nicht möglich.

Insgesamt weisen diese Befunde auf eine effiziente Regulation in der Expression des rif-IIb Gens hin. Dafür spricht bereits das Vorhandensein des potentiellen Attenuators Rif-TA im kodierenden Bereich des rif-I Gens, dessen Wirksamkeit *in vivo* allerdings noch nicht gezeigt werden konnte.

Wenn die Regulation der Genexpression des 3d^{r1f} Fragments auf Ebene der Transkription erfolgt, müßte der Regulationsmechanismus so beschaffen sein, daß er nicht nur Transkription durch *E. coli* RNA-Polymerase, sondern auch durch T7 RNA-Polymerase steuert.

Doch auch eine Regulation auf der Ebene der Translation ist denkbar. So wurde eine post-transkriptionale Regulation der Genexpression durch Proteine in mehreren Fällen gefunden. Dabei erfolgt die Bindung des Repressors direkt an spezifische Stellen auf der mRNA. Es sind Autoregulationsmechanismen bekannt, wo ein Protein, z.B. das Genprodukt 32 des Phagen T4, spezifisch die Translation seiner eigenen mRNA steuert (von Hippel *et al.*, 1982). Es gibt jedoch auch Beispiele, wo das Protein (Hüllprotein des Phagen MS2) die Translation der mRNA eines fremden Gens (MS2 Replicase) reprimiert (Uhlenbeck *et al.*, 1983) oder wo ein einziges Protein (RegA Protein von T4) als Repressor der Translation einer großen Anzahl von mRNA-Spezies wirken kann (Wiberg und Karam, 1983). Die vorliegenden Daten erlauben noch nicht, ein Regulationsmodell der Expression von Rif-IIb aufzustellen. Es kann jedoch zweifelsfrei gezeigt werden, daß eine Regulation stattfinden muß.

Dies steht im Einklang mit dem Befund von Skrobranek (1988), der bei Klonierung des 3d^{r1f} Fragments hinter den *E. coli* *tac* Promotor und einer Genexpression durch die *E. coli* RNA-Polymerase ebenfalls keine Stimulierung der Synthese von Rif-IIb zeigen konnte.

Dieser Befund ist für die weitere Erforschung der durch das 3d^{r1f} Fragment vermittelten *rpoB* unabhängigen Rifampicin-Resistenz sehr bedeutungsvoll. Es ist offenbar bedingt durch eine - noch unbekannte - Repression nicht möglich, bei Verwendung des 3d^{r1f} Fragments eine Überexpression von Rif-IIb in *E. coli* zu erreichen.

Wenn keine Regulation der Genexpression durch Rif-IIb selbst erfolgt, könnte die Überexpression durch Deletion von 5'-seitig von *rif-IIb* liegenden regulatorischen Sequenzbereichen geschehen. Dabei darf jedoch die ribosomale Bindungsstelle auf der Rif-IIb-mRNA nicht wie bei Skrobranek (1988) innerhalb einer RNA-Sekundärstruktur liegen. Ansonsten ist es erforderlich, ein anderes - am besten eukaryotisches - System zur Expression von Rif-IIb zu wählen, bei dem dieser Regulationsmechanismus nicht existieren würde.

LITERATURVERZEICHNIS

- Alton, N.K. & Vapnek, D. (1979)
Nucleotide sequence analysis of the chloramphenicol resistance transposon Tn9.
Nature **282**, 864-869.
- Amann, E., Brosius, J. & Ptashne, M. (1983)
Vectors bearing a hybrid *trp-lac* promotor useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*.
Gene **25**, 167-178.
- Astell, C.R., Smith, M., Chow, M.B. & Ward, D.C. (1979)
Structure of 3' hairpin termini of four rodent parvovirus genomes: nucleotide sequence homology at origins of replication.
Cell **17**, 691-703.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Smith, J.A., Seidman, J.G. & Struhl, K. (1987)
Current protocols in molecular biology.
Wiley & Sons, New York.
- Axelrod, V.D. & Kramer, F.R. (1985)
Transcription from bacteriophage T7 and SP6 promoters in the presence of 3'-deoxyribonucleoside 5'-triphosphate chain terminators.
Biochemistry **24**, 5716-5723.
- Axelrod, V.D., Vartikyan, R.M., Aivazashvilli, V.A. & Bebelashvilli, R.S. (1978)
Specific termination of RNA polymerase synthesis as a method of RNA and DNA sequencing.
Nucleic Acids Res. **5**, 3549-3563.
- Backman, K. & Boyer, H.W. (1983)
Tetracycline resistance determined by pBR322 is mediated by one polypeptide.
Gene **26**, 197-203.
- Bear, D.G. & Peabody, D.S. (1988)
The *E. coli* Rho protein: an ATPase that terminates transcription.
TIBS **13**, 343-347.
- Birnboim, C. & Doly, J. (1979)
Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acids Res. **7**, 1513-1523.
- Birnstiel, M.L., Busslinger, M. & Strub, K. (1985)
Transcription termination and 3' processing: the end is in site!
Cell **41**, 349-359.

- Bolivar, F. Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L. & Boyer, H.W. (1977)
Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system.
Gene **2**, 95-113.
- Brawner, M.E., Auerbach, J.I., Fornwald, J.A., Rosenberg, M. & Taylor, D.P. (1985)
Characterization of *Streptomyces* promotor sequences using the *Escherichia coli* galactokinase gene.
Gene **40**, 191-201.
- Brendel, V. & Trifonov, E.N. (1984)
A computer algorithm for testing potential prokaryotic terminators.
Nucleic Acids Res. **12**, 4411-4427.
- Briat, J.-F., Bollag, G., Kearney, C.A., Molineux, I. & Chamberlin, M.J. (1987)
Tau factor from *Escherichia coli* mediates accurate and efficient termination of transcription at the bacteriophage T3 early termination site *in vitro*.
J. Mol. Biol. **198**, 43-49.
- Briat, J.-F. & Chamberlin, M.J. (1984)
Identification and characterization of a new transcriptional termination factor from *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 7373-7377.
- Brosius, J., Dull, T.J., Sleeter, D.D. & Noller, H.F. (1981)
Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*.
J. Mol. Biol. **148**, 107-127.
- Brown, S., Albrechtsen, B., Pedersen, S. & Klemm, P. (1982)
Localization and regulation of the structural gene for transcription-termination factor rho of *Escherichia coli*.
J. Mol. Biol. **162**, 283-298.
- Brown, T., Hunter, W.N., Kneale, G. & Kennard, O. (1986)
Molecular structure of the G-A base pair in DNA and its implications for the mechanism of transversion mutations.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 2402-2406.
- Burnette, W.N. (1981)
"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody radioiodinated with protein A.
Anal. Biochem. **112**, 75-85.
- Calladine, C.R. (1982)
Mechanisms of sequence-dependent stacking of bases in B-DNA.
J. Mol. Biol. **161**, 345-352.

- Campbell, J.L., Richardson, C.C. & Studier, F.W. (1978)
Genetic recombination and complementation between bacteriophage T7
and cloned fragments of T7 DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 2276-2280.
- Carter, A.D., Morris, C.E. & McAllister, W.T. (1981)
Revised transcription map of the late region of bacteriophage T7
DNA.
J. Virol. **37**, 636-642.
- Chamberlin, M.J., McGrath, J. & Waskell, L. (1970)
New RNA polymerase from *Escherichia coli* infected with
bacteriophage T7.
Nature **228**, 227-231.
- Chamberlin, M.J., Kingston, R., Gilman, M., Wiggs, J. & DeVera, A.
(1983)
Isolation of bacterial and bacteriophage RNA polymerases and their
use in synthesis of RNA *in vitro*.
Methods Enzymol. **101**, 540-569.
- Chang, A.C.Y. & Cohen, S.N. (1978)
Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning
vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid.
J. Bacteriol. **134**, 1141-1156.
- Christie, G.E., Farnham, P.J. & Platt, T. (1981)
Synthetic sites for transcription termination and a functional
comparison with tryptophan operon termination sites *in vitro*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 4180-4184.
- Close, T.J. & Rodriguez, R.L. (1982)
Construction and characterization of the chloramphenicol-resistance
gene cartridge: a new approach to the transcriptional mapping of
extrachromosomal elements.
Gene **20**, 305-316.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. & Hsu, L. (1972)
Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria:
Genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69**, 2110-2114.
- Connamacher, R.H. & Mandel, H.G. (1968)
Studies on the intracellular localization of tetracycline in bacteria.
Biochim. Biophys. Acta **166**, 475-486.
- D'Allesio, J.M. (1982)
RNA sequencing. In: Gel electrophoresis of nucleic acids. A practical
approach.
Rickwood, D. & Hames, B.D. eds., IRL Press, Oxford, Washington,
D.C., pp. 173-198.
- De Boer, H.A., Comstock, L.J. & Vasser, M. (1983)
The *tac* promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac*
promoters.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 21-25.

- Deng, Z., Kieser, T. & Hopwood, D.A. (1987)
Activity of a *Streptomyces* transcriptional terminator in *Escherichia coli*.
Nucleic Acids Res. **15**, 2665-2675.
- Donis-Keller, H., Maxam, A.M. & Gilbert, W. (1977)
Mapping adenines, guanines and pyrimidines in RNA.
Nucleic Acids Res. **4**, 2527-2548.
- Dunn, J.J. & Studier, F.W. (1980)
The transcription termination site at the end of the early region of bacteriophage T7 DNA.
Nucleic Acids Res. **8**, 2119-2132.
- Dunn, J.J. & Studier, F.W. (1983)
Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 and the DNA locations of T7 genetic elements.
J. Mol. Biol. **166**, 477-536.
- Farnham, P.J. & Platt, T. (1981)
Rho-dependent termination: dyad symmetry in DNA causes RNA polymerase to pause during transcription *in vitro*.
Nucleic Acids Res. **9**, 563-577.
- Fuerst, T.R., Niles, E.G., Studier, F.W. & Moss, B. (1986)
Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 8122-8126.
- Gaastra, W. & Jorgensen, P.C. (1984)
The extraction and isolation of DNA from gels. In: *Methods in Molecular Biology 2. Nucleic Acids*.
pp 67-76.
- Gentz, R., Langner, A., Chang, A.C.Y., Cohen, S.N. & Bujard, H. (1981)
Cloning and analysis of strong promoters is made possible by the downstream placement of a RNA termination signal.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 4936-4940.
- Gilbert, W. (1976)
Starting and stopping sequences for the RNA polymerase. In: *RNA-Polymerase*.
Losick, R. & Chamberlin, M. (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp. 193-205.
- Ginsburg, D. & Steitz, J.A. (1975)
The 30S ribosomal precursor RNA from *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. **250**, 5647-5654.
- Goldberg, A.R., & Hurwitz, J. (1972)
Studies on termination of *in vitro* ribonucleic acid synthesis by rho factor.
J. Biol. Chem. **147**, 5637-5645.

- Golomb, M. & Chamberlin, M. (1974)
A preliminary map of the major transcription units read by T7
RNA polymerase on the T7 and T3 bacteriophage chromosomes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **71**, 760-764.
- Gorman, C.M., Moffat, L.F. & Howard, B.H. (1982)
Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase
in mammalian cells.
Mol. Cell. Biol. **2**, 1044-1051.
- Grachev, M.A. & Pletnev, A.G. (1981)
The nucleotide sequence of gene 1 of phage T7 DNA which codes
for the phage-specific DNA-dependent RNA-polymerase.
FEBS Letters **127**, 53-56.
- Grayhack, E.J., Yang, X., Lau, L. F. & Roberts, J.W. (1985)
Phage lambda gene Q antiterminator recognizes RNA polymerase near
the promotor and accelerates it through a pause site.
Cell **42**, 259- 269.
- Grierson, D. (1982)
Gel electrophoresis of RNA. In: Gel electrophoresis of nucleic
acids. A practical approach.
Rickwood, D. & Hames, B.D. eds., IRL Press, Oxford, Washington
D.C., pp. 1-38.
- Guarente, L.P. & Beckwith, J. (1978)
Mutant RNA polymerase of *Escherichia coli* terminates transcription in
strains making defective rho factor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 294-297.
- Hanahan, D. (1983)
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.
J. Mol. Biol. **166**, 557-580.
- Hartmann, G.R., Biebricher, C., Glaser, S.J., Grosse, F., Katzameyer, M.J.,
Lindner, A.J., Mosig, H., Nasheuer, H.-P., Rothman-Denes, L.B.,
Schäffner, A.R., Schneider, G.J., Stetter, K.-O. & Thomm, M. (1988)
Initiation of transcription - a general tool for affinity labelling of
RNA polymerases by autocatalysis.
Biol. Chem. Hoppe-Seyler **369**, 775-788.
- Hartmann, G.R., Heinrich, P., Kollenda, M.C., Skrobranek, B., Tropschug,
M. & Weiß, W. (1985)
Molekulare Wirkungsweise des Antibiotikums Rifampicin.
Angew. Chem. **97**, 1011-1017.
- Hatfield, G.W., Sharp, J. & Rosenberg, M. (1983)
Pausing and termination of human RNA polymerase at a prokaryotic
terminator.
Mol. Cell. Biol. **3**, 1687-1693.
- Hay, N., Skolnik-David, H. & Aloni, Y. (1982)
Attenuation in the control of SV40 gene expression.
Cell **29**, 301-313.

- Hecht, M.H., Nelson, H.C.M. & Sauer, R.T. (1983)
Mutations in Lambda repressor's amino-terminal domain: implications for protein stability and DNA binding.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 2676-2680.
- Heinrich, P. (1987)
Klonierung und Sequenzierung von Rifampicin-Resistenzgenen.
Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Henderson, E., Hardin, C.C., Wall, S.K., Tinoco Jr., I. & Blackburn, E.H. (1987)
Telomeric DNA oligonucleotides form novel intramolecular structures containing guanine-guanine base pairs.
Cell **51**, 899-908.
- HöB, A., Arthur, A., Wanner, G. & Fanning, E. (1988)
Use of ion exchange resin to recover poorly soluble recombinant proteins in active form from bacterial extracts.
Biotechnology, im Druck
- Horowitz, H. & Platt, T. (1982)
A termination site for *lacI* transcription is between the CAP site and the *lac* promoter.
J. Biol. Chem. **257**, 11740-11746.
- Hyman, R.W. (1971)
Physical mapping of T7 messenger RNA.
J. Mol. Biol. **61**, 169-376.
- Jaurin, B. & Cohen, S.N. (1984)
Streptomyces lividans RNA polymerase recognizes and uses *Escherichia coli* transcription signals.
Gene **28**, 83-91.
- Kassavetis, G.A., Butler, E.T., Roulland, D. & Chamberlin, M.J. (1981)
Bacteriophage SP6-specific RNA polymerase. Mapping of SP6 DNA and selective *in vitro* transcription.
J. Biol. Chem. **257**, 5779-5788.
- Kassavetis, G.A. & Chamberlin, M.J. (1981)
Pausing and termination of transcription within the early region of bacteriophage T7 *in vitro*.
J. Biol. Chem. **256**, 2777-2786.
- Kiss, A., Sain, B. & Venetianer, P. (1977)
The number of rRNA genes in *Escherichia coli*.
FEBS Letters **79**, 77-79.
- Kramer, F.R. & Mills, D.R. (1978)
RNA sequencing with radioactive chain-terminating ribonucleotides.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 5334-5338.
- Laemmli, U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature **227**, 680-685.

- Landick, R., Carey, J. & Yanofsky, C. (1987)
Detection of transcription-pausing *in vivo* in the *trp* operon leader region.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 1507-1511.
- Landick, R. & Yanofsky, C. (1987)
Transcription attenuation. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*.
F.C. Neidhardt, ed. American Society for Microbiology, Washington D.C. pp 1276-1301.
- Little, P.F.R. & Jackson, I.J. (1988)
Application of plasmids containing promoters specific for phage-encoded RNA polymerases. In: DNA cloning III.
D.M. Glover, ed. IRL Press, Oxford, Washington D.C.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982)
Molecular cloning. A laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Mark, D.F. & Richardson, C.C. (1976)
Escherichia coli thioredoxin: a subunit of bacteriophage T7 DNA polymerase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73**, 780-784.
- Martin, F.H. & Tinoco, I.Jr. (1980)
DNA-RNA hybrid duplexes containing (dA-rU) sequences are exceptionally unstable and may facilitate termination of transcription.
Nucleic Acids Res. **8**, 2295-2299.
- Masters, B.S., Stohl, L.L. & Clayton, D.A. (1987)
Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those encoded by bacteriophages T3 and T7.
Cell **51**, 89-99.
- Maxam, A.M. & Gilbert, W. (1980)
Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages.
Methods Enzymol. **65**, 499-560.
- McAllister, W.T. & McCarron, R.J. (1977)
Hybridization of the *in vitro* products of bacteriophage T7 RNA polymerase to restriction fragments of T7 DNA.
Virology **82**, 288-298.
- McAllister, W.T., Morris, C., Rosenberg, A.H. & Studier, F.W. (1981)
Utilization of bacteriophage T7 late promoters in recombinant plasmids during infection.
J. Mol. Biol. **153**, 527-544.
- McGraw, N.J., Bailey, J.N., Cleaves, G.R., Dembinski, D.R., Gocke, C.R., Joliffe, L.K., MacWright, R.S. & McAllister, W.T. (1985)
Sequence and analysis of the gene for bacteriophage T3 RNA polymerase.
Nucleic Acids Res. **15**, 6753-6766.

- Meinkoth, J. & Wahl, G. (1984)
Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports.
Anal. Biochem. **138**, 267-284.
- Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K. & Green, M.R. (1984)
Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter.
Nucleic Acids Res. **12**, 7035-7056.
- Messing, J. & Viera, J. (1982)
A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double digest restriction fragments.
Gene **19**, 269-276.
- Misuzawa, S., Nishimura, S. & Seela, F. (1986)
Improvement of the dideoxy chain termination method of DNA sequencing by use of deoxy-7-deazaguanosine triphosphate in the place of dGTP.
Nucleic Acids Res. **14**, 1319- 1324.
- Moffat, B.A., Dunn, J.J. & Studier, F.W. (1984)
Nucleotide sequence of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase.
J. Mol. Biol. **173**, 265-269.
- Moreau, J., Marcaud, L., Maschat, F., Kejzlarova-Lepesant, J., Lepesant, J.-A. & Scherrer, K. (1982)
A + T rich linkers define functional domains in eukaryotic DNA.
Nature **295**, 260-262.
- Mosig, H. (1982)
Die Wirkung von Nukleosiden und deren Analoga auf die Initiation der RNA Polymerase.
Diplomarbeit. Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Mulligan, R. & Berg, P. (1981)
Selection for animal cells that express *Escherichia coli* gene coding for xanthine-guanine phosphoribosyltransferase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 2072-2076.
- Murphy, J.T., Burgess, R.R., Dahlberg, J.E. & Lund, E. (1982)
Transcription of the gene for human U1 small nuclear RNA.
Cell **29**, 265-274.
- Niles, E.G. & Condit, R.C. (1975)
Translational mapping of bacteriophage T7 RNAs synthesized *in vitro* by purified T7 RNA polymerase.
J. Mol. Biol. **98**, 57-67.
- Pabo, C.O. & Sauer, R.T. (1984)
Protein-DNA recognition.
Ann. Rev. Biochem. **53**, 293-321.

- Pinkam, J.L. & Platt, T. (1983)
The nucleotide sequence of the *rho* gene of *E. coli* K-12.
Nucleic Acids Res. **11**, 3531-3545.
- Platt, T. (1981)
Termination of transcription and its regulation in the tryptophan operon in *Escherichia coli*.
Cell **24**, 10-23.
- Platt, T. (1986)
Transcription termination and the regulation of gene expression.
Annu. Rev. Biochem. **55**, 339-372.
- Puglisi, J.D., Wyatt, J.R. & Tinoco Jr., I. (1988)
A pseudoknotted RNA oligonucleotide.
Nature **331**, 283-286.
- Rauschel, B. (1985)
Zur selektiven Transkription durch RNA Polymerase.
Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Reisbig, R.R. & Hearst, J.E. (1981)
Escherichia coli deoxyribonucleic acid dependent ribonucleic polymerase transcriptional pause sites on SV40 DNA F1.
Biochemistry **20**, 1907-1918.
- Rhodes, G. & Chamberlin, M.J. (1974)
Ribonucleic acid chain elongation by *Escherichia coli* polymerase. I. Isolation of ternary complexes and the kinetics of elongation.
J. Biol. Chem. **249**, 1907-1918.
- Riley, M., Maling, B. & Chamberlin, M.J. (1966)
Physical and chemical characterization of two- and three-stranded adenine-thymine and adenine-uracil homopolymer complexes.
J. Mol. Biol. **20**, 359-389.
- Robertson, H.D., Dixon, E. & Dunn, J.J. (1977)
A nucleotide sequence from a ribonuclease III processing site in bacteriophage T7 DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 822-826.
- Rosen, J., Ryder, T., Ohtsubo, H. & Ohtsubo, E. (1981)
Role of RNA transcripts in replication incompatibility and copy number control in antibiotic resistance plasmid derivatives.
Nature **290**, 794-797.
- Rosenberg, A.H., Lade, B.N., Chui, D.-S., Lin, S.-W. Dunn, J.J. & Studier, F.W. (1987)
Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 polymerase.
Gene **56**, 125-135.
- Rosenberg, M., Chepelinsky, A.B., McKenney, K. (1983)
Studying promoters and terminators by gene fusion.
Science **222**, 734-739.

- Rosenberg, M. & Court, D. (1979)
Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription.
Annu. Rev. Genet. **13**, 319-353.
- Rosenberg, M., Court, D., Shimatake, H., Brady, C. & Wulff, D.L. (1978)
The relationship between function and DNA sequence in an intercistronic regulatory region in phage Lambda.
Nature **272**, 414-423.
- Rouviere-Yaniv, J. & Gros, F. (1975)
Characterization of a novel, low-molecular-weight DNA-binding protein from *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**, 3428-3432.
- Russel, M. & Model, P. (1984)
Replacement of the *fip* gene of *E. coli* by an inactive gene cloned on a plasmid.
J. Bacteriol. **159**, 1034-1039.
- Sanger, F., Micklen, S. & Coulson, A.R. (1977)
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 5463-5467.
- Sarkar, S. & Thach, R. E. (1968)
Inhibition of formylmethionyl-transfer RNA binding to ribosomes by tetracycline.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **60**, 1479-1486.
- Schäffner, A. (1984)
Spezifitäten der Weizenkeim RNA-Polymerase II bei der abortiven Initiation am Nopalinsynthase-Gen.
Diplomarbeit. Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Schenborn, E.T. & Mierendorf Jr., R.C. (1985)
A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: dependence on template structure.
Nucleic Acids Res. **13**, 6223-6236.
- Schmidt, M.C. & Chamberlin, M.J. (1987)
Amplification and isolation of *Escherichia coli nusA* protein and studies of its effect on *in vitro* RNA chain elongation.
J. Mol. Biol. **195**, 809-818.
- Schulze, M. & Rödel, G. (1988)
SCO 1, a yeast nuclear gene essential for accumulation of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit II.
Mol. Gen. Genet. **211**, 492-498.
- Shaw, W.V. (1975)
Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol resistant bacteria.
Methods Enzymol. **43**, 737-755.

- Shaw, W.V., Packman, L.C., Burleigh, B.D., Dell, A., Morris, H.R. & Hartley, B. S. (1979)
Primary structure of chloramphenicol acetyltransferase specified by R plasmids.
Nature **282**, 870-872.
- Shefflin, L.G. & Kowalski, K. (1985)
Altered DNA conformations detected by mung bean nuclease occur in promotor and terminator regions of supercoiled pBR322 DNA.
Nucleic Acids Res. **13**, 6137-6154.
- Shimatake, H. & Rosenberg, M. (1981)
Purified Lambda protein cII positively activates promoters for lysogenic development.
Nature **292**, 128-132.
- Shine, J. & Dalgarno, L. (1975)
Determinants of cistron specificity in bacterial ribosomes.
Nature **254**, 34-38.
- Shortle, D., DiMaio, D. & Nathans, D. (1981)
Directed mutagenesis.
Annu. Rev. Gen **15**, 265-294.
- Skrobranek, B. (1988)
Gen und Genprodukt für eine rpoB unabhängige Rifampicinresistenz in *Escherichia coli*.
Dissertation. Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Soberon, X., Covarrubias, L. & Bolivar, F. (1980)
Construction and characterization of new cloning vehicles. IV. Deletion derivatives of pBR322 and pBR325.
Gene **9**, 287-305.
- Spassky, A., Rimsky, S., Garreau, H. & Buc, H. (1984)
Hla, an *E. coli* DNA-binding protein which accumulates in stationary phase, strongly compacts DNA *in vitro*.
Nucleic Acids Res. **12**, 5321-5340.
- Steen, R., Dahlberg, A.E., Lade, B.N., Studier, F.W. & Dunn, J.J. (1986)
T7 RNA polymerase directed expression of the *Escherichia coli* *rnaB* operon.
EMBO J. **5**, 1099-1103.
- Stroynowski, I., Kuroda, M. & Yanofsky, C. (1983)
Transcription termination *in vitro* at the tryptophan operon is controlled by secondary structures in the leader transcript.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 2206-2210.
- Studier, F.W. & Moffat, B.A. (1986)
Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.
J. Mol. Biol. **189**, 113-130.

- Studier, F.W. & Rosenberg, A.H. (1981)
Genetic and physical mapping of the late region of bacteriophage T7 DNA by use of cloned fragments of T7 DNA.
J. Mol. Biol. **153**, 503-525.
- Sutcliffe, J. G. (1979)
Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322.
Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. **43**, 77-90.
- Tabor, S. & Richardson, C.C. (1985)
A bacteriophage T7 polymerase/promotor system for controlled exclusive expression of specific genes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 1074-1078.
- Tait, R.C. & Boyer, H.W. (1978)
On the nature of tetracycline resistance controlled by the plasmid pSC101.
Cell **13**, 73-81.
- Tanaka, S., Igarashi, K. & Kaji, A. (1972)
Studies on the action of tetracycline and puromycin.
J. Biol. Chem. **247**, 45-50.
- Tinoco Jr., I., Borer, P.N., Dengler, B., Levine, M.D., Uhlenbeck, O.C., Crothers, D.M. & Gralla, J. (1973)
Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acid.
Nature New Biology **246**, 40-41.
- Trifonov, E.N. (1980)
Sequence-dependent deformational anisotropy of chromatin DNA.
Nucleic Acids Res. **8**, 4041-4053.
- Tropschug, M. (1981)
Untersuchungen zur Aufnahme von Rifamycinen in *Escherichia coli* K12.
Dissertation. Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Uhlenbeck, O.C., Carey, J., Romaniuk, P.J., Lowony, P.T. & Beckel, D. (1983)
Interactions of R17 coat protein with its RNA binding site for translational repression.
J. Biomol. Struct. Dynamics **1**, 539-552.
- Viera, J. & Messing, J. (1982)
The pUC-plasmids, a M12mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers.
Gene **19**, 259-268.
- Vogelstein, B & Gillespie, D. (1979)
Preparative and analytical purification of DNA from agarose.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 615- 619.

- Von Hippel, P.H., Bear, D.G., Morgan, W.D. & McSwiggen, J.A. (1984)
Protein-nucleic acid interaction in transcription: a molecular analysis.
Annu. Rev. Biochem. **53**, 389-446.
- Von Hippel, P.H., Kowalczykowski, S.C., Lonberg, N., Newport, J.W., Paul, L.S., Stormo, G.D. & Gold, L. (1982)
Autoregulation of gene expression: quantitative evaluation of the expression of the bacteriophage T4 gene 32 (single stranded DNA binding) protein system.
J. Mol. Biol. **162**, 795-818.
- WeiB, W. (1985)
Die abortive Initiation - Ein Vergleich der RNA Polymerasen aus *Micrococcus luteus* und *Escherichia coli*.
Diplomarbeit. Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- West Jr., R.W. & Rodriguez, R.L. (1982)
Construction and characterization of *E. coli* promotor-probe plasmid vectors. III. pBR322 derivatives with deletions in the tetracycline resistance promotor region.
Gene **20**, 291-304.
- Wiberg, J.S. & Karam, J.D. (1983)
Translational regulation in T4 phage development.
In: Bacteriophage T4.
C.K. Mathews, E.M. Kutter, G. Mosig, P.B. Berget, ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Yager, T.D. & von Hippel, P.H. (1987)
Transcript elongation and termination in *E. coli*. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*.
F.C. Neidhardt, ed. American Society for Microbiology, Washington D.C. pp 1241-1275.
- Yang, R.C.-A., Lis, J. & Wu, R. (1979)
Elution of DNA from agarose gels after electrophoresis.
Methods Enzymol. **68**, 176-182.
- Yannish-Perron, C., Viera, J. & Messing, J. (1985)
Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.
Gene **33**, 103-119.
- Zinn, K., DiMaio, D. & Maniatis, T. (1983)
Identification of two distinct regulatory regions adjacent to the human- β -interferon gene.
Cell **34**, 865-879.

ABKÜRZUNGEN

A _x	Extinktion bei einer Wellenlänge x
Ap	Ampicillin
BSA	Rinderserum-Albumin
Ci	Curie (1 Ci = 3,7 x 10 ⁹ Bequerel)
CM	Chloramphenicol
DTT	Dithiothreitol
Ipm	Impulse pro Minute
Km	Kanamycin
NET-Puffer	NaCl-EDTA-Tris Puffer (S. 16)
OD	Optische Dichte
SSC-Puffer	NaCl-NaCitrat Puffer (S. 23)
SSPE-Puffer	NaCl-Phosphat-EDTA Puffer (S. 65)
TBE-Puffer	Tris-HCl-Borsäure-EDTA Puffer (S. 24)
TBS-Puffer	Tris-HCl-NaCl Puffer (S. 72)
Tc	Tetracyclin
TG-Puffer	Tris-Glycin-SDS Puffer (S. 27)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl-β-galactosid

VERZEICHNIS DER PLASMIDE

Bezeichnung	Vektor	Insertion	Seite
pT7-4T	pT7-4/ <i>EcoRI</i> + <i>SacI</i>	T 58 bp	34
pT7-4S1	pT7-4/ <i>EcoRI</i> + <i>SacI</i>	S1 58 bp	34
pT7-4S2	pT7-4/ <i>EcoRI</i> + <i>SacI</i>	S2 60 bp	34
pT7-5K	pT7-5/ <i>HindIII</i> + <i>PstI</i>	K 60 bp	34
pT7-4CB	pT7-4/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i>	T7- <i>Cla</i> C/ <i>Hpa</i> B 794 bp	38
pT7-4TPhiL	pT7-4/ <i>AccI</i>	T7- <i>HinP</i> C 126 bp	40
pT7-4TPhiR	pT7-4/ <i>AccI</i>	T7- <i>HinP</i> C 126 bp	40
pT7-4DA	pT7-4/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i>	T7- <i>Cla</i> D/ <i>Hae</i> A 0,9 kb	44
pT7-R	pT7-4/ <i>HindIII</i> + <i>SmaI</i>	R 0,7 kb	46
pT7-R1	pT7-4/ <i>EcoRI</i> + <i>AccI</i>	R1 (<i>Hpa</i> A) 397 bp	50
pT7-R2	pT7-4/ <i>AccI</i> + <i>HindIII</i>	R2 (<i>Hpa</i> B) 296 bp	50
pT7-R2T	pT7-4T/ <i>AccI</i> + <i>HindIII</i>	R2 (<i>Hpa</i> B) 296 bp + T	50
pT7-R3T	pT7-4/ <i>EcoRI</i> + <i>AccI</i>	R3T (<i>HinP</i> D) 229 bp	50
pRif-4	pT7-4/ <i>EcoRI</i> + <i>PstI</i>	3d ^{rif} 2,15 kb	53
pRif-6	pT7-6/ <i>EcoRI</i> + <i>PstI</i>	3d ^{rif} 2,15 kb	53
pRif-4T	pRif-4/ <i>EcoRI</i> + <i>SmaI</i>	3d ^{rif} 2,15 kb + T	53
pTet-4	pT7-4/ <i>HindIII</i> + <i>AvaI</i>	Tet 1,4 kb + T	56
pTet-6	pT7-6/ <i>HindIII</i> + <i>AvaI</i>	Tet 1,4 kb + T	56
pTet-4T	pTet-4/ <i>EcoRI</i> + <i>SacI</i>	T 58 bp + Tet	56
pTet-6T	pTet-6/ <i>EcoRI</i> + <i>SacI</i>	T 58 bp + Tet	56
pCat-4	pT7-4/ <i>HindIII</i> + <i>BamHI</i>	Cat 1,75 kb	60
pCat-6	pT7-6/ <i>HindIII</i> + <i>BamHI</i>	Cat 1,75 kb	60
pCat-4T	pT7-4T/ <i>HindIII</i> + <i>BamHI</i>	Cat 1,75 kb + T	60
pCat-6T	pT7-6T/ <i>HindIII</i> + <i>BamHI</i>	Cat 1,75 kb + T	60
pCat-4S1	pT7-4S1/ <i>HindIII</i> + <i>BamHI</i>	Cat 1,75 kb + S1	60
pCat-4S2	pT7-4S2/ <i>HindIII</i> + <i>BamHI</i>	Cat 1,75 kb + S2	60
pCat-6Phi	pCat-6/ <i>glatt</i> + <i>SacI</i>	T7- <i>HinP</i> C 126 bp + Cat	62
pCat-6R	pCat-6/ <i>glatt</i> + <i>SacI</i>	R3 144 bp + Cat	62

LEBENS LAUF

Name:	Wolfgang Weiß
geboren:	6. August 1959
Geburtsort:	Freyung
Eltern:	Christoph und Rosa Weiß, geb. Tremel
Schule:	
1965 - 1969	Volksschule an der Zielstattstraße, München
1969 - 1978	Erasmus-Grasser-Gymnasium, München
1978	Abitur
Studium:	
1978 - 1984	Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Nov. 1983	Diplomhauptprüfung
Jan. 1984 - Jan. 1985	Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität, München unter Anleitung von Prof. Dr. G. Hartmann mit dem Titel: "Die abortive Initiation - ein Vergleich der RNA-Polymerasen aus <i>Micrococcus luteus</i> und <i>Escherichia coli</i> "
ab Mai 1985	Doktorarbeit am selben Institut unter Anleitung von Prof. Dr. G. Hartmann

